

**Charakterisierung von Drosophila melanogaster-DNA
aus der Region 74F**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

PETRA RETTBERG

Bochum 1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Charakterisierung von Drosophila melanogaster-DNA
aus der Region 74F**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
PETRA RETTBERG

Bochum 1987

Bei allen, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, insbesondere bei den Mitarbeitern des Projekts "74EF/75B", möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. O. Pongs für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und sein ständiges Interesse am Fortgang der Arbeit.

Abkürzungen

B	- Basen
β -Ecdyson	- 20-OH-Ecdyson
Bp	- Basenpaare
BSA	- Rinderserumalbumin
cDNA	- "copy"DNA
cpm	- Zählereignisse pro Minute
dATP	- 2'-Desoxy-adenosin-5'-triphosphat
dCTP	- 2'-Desoxy-cytidin-5'-triphosphat
ddNTP	- 2',3'-Didesoxinukleosid-5'-triphosphat
dGTP	- 2'-Desoxy-guanosin-5'-triphosphat
dNTP	- 2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dTTP	- 2'-Desoxy-thymidin-5'-triphosphat
EDTA	- Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	- 1,2-Bis-(2-aminoethoxy-ethan)-N,N,N',N'-tetra- essigsäure
FA	- Formaldehyd
g	- Erdbeschleunigung
IPTG	- Isopropyl- β -D-thiogalactosid
mRNA	- "messenger"RNA
MOPS	- (3-(N-Morpholino)propan)sulfonsäure
PEG	- Polyethylenglykol
PS	- Puffstadium
rpm	- Umdrehungen pro Minute
RT	- Raumtemperatur
SDS	- Natriumdodekylsulfat
Tris	- Tris(hydroxymethyl)aminomethan
X-Gal	- 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

Herkunft der verwendeten Enzyme und Chemikalien

Agarose	- Gibco/BRL (Eggenstein)
Ampicillin	- Boehringer (Mannheim)
$\alpha^{32}\text{P}$ -dNTPs	- New England Nuclear (Dreieich)
$\alpha^{35}\text{S}$ -dATP	- New England Nuclear (Dreieich)
β -Ecdyson	- Simes (Mailand)
Cycloheximid	- Boehringer (Mannheim)
Ethidiumbromid	- Serva (Heidelberg)
Ficoll 400	- Pharmacia (Freiburg)
Grace's Insekten- Gewebekultur-Medium	- Gibco/BRL (Eggenstein)
Methylquecksilberhydroxid	- Ventron (Karlsruhe)
Polyvinylpyrrolidon	- Sigma (München)
Sequenzierungsprimer	- Pharmacia (Freiburg) und Stratagene (San Diego)
Sephadex G-100	- Pharmacia (Freiburg)

Die Enzyme wurden von den Firmen Pharmacia, Boehringer, Gibco/BRL, Serva und Sigma bezogen.

Alle anderen Chemikalien waren p.a. von den Firmen Merck, Serva, Baker und Fluka.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Material und Methoden</u>	6
2.1. Herkunft der λ -Phagen mit insertierter genomischer DNA aus dem Locus 74EF von <u>D. melanogaster</u>	6
2.2. Isolierung von DNA	6
2.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA	6
2.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus 2 ml- Kulturen	7
2.2.1.2. Präparative Plasmid-Isolierung	7
2.2.2. Isolierung von DNA aus M13-Phagen	8
2.2.2.1. Isolierung doppelsträngiger DNA der replikativen Form (RF-DNA) von M13	9
2.2.2.2. Isolierung von Einzelstrang-DNA	9
2.2.3. Isolierung von λ -DNA (Minipräparation)	10
2.2.4. Isolierung von DNA aus <u>D. melanogaster</u>	10
2.3. Subklonierung	11
2.3.1. Restriktion und elektrophoretische Auf- trennung von DNA-Fragmenten auf Agarose- gelen	11
2.3.2. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose- gelen	12
2.3.3. Präparation von Vektor-DNA	12
2.3.4. Herstellung von kompetenten Bakterien, Ligation und Transformation	13
2.4. Isolierung von RNA	15
2.4.1. Isolierung von RNA der verschiedenen Entwicklungsstadien von <u>D. melanogaster</u>	15
2.4.2. Isolierung von RNA aus Larvengewebe	16
2.4.2.1. <u>In vitro</u> -Inkubation von Speicheldrüsen und Fettkörpergewebe	16
2.4.2.2. Isolierung von RNA aus Speicheldrüsen mit heißem Phenol	17

	Seite
2.4.2.3. Isolierung von RNA aus Fettkörpergewebe mit Guanidinthiocyanat	18
2.4.3. Isolierung polyadenylierter RNA	18
2.4.4. Elektrophoretische Auftrennung von RNA auf denaturierenden Agarosegelen	18
2.4.4.1. Agarosegele mit Methylquecksilberhydroxid	18
2.4.4.2. Agarosegele mit Formaldehyd	19
2.5. Transfer von Nukleinsäuren auf Nylon- membranen	20
2.5.1. Transfer gelelektrophoretisch aufgetrenn- ter DNA-Fragmente auf Nylonmembranen (Southern-Transfer)	20
2.5.2. Transfer gelelektrophoretisch aufgetrenn- ter RNA auf Nylonmembranen (Northern- Transfer)	21
2.6. Herstellung radioaktiv markierter Proben	22
2.6.1. Herstellung radioaktiv markierter DNA durch "Nick-Translation"	22
2.6.2. Herstellung radioaktiv markierter RNA durch <u>in vitro</u> -Transkription	23
2.7. Hybridisierung an immobilisierte Nuklein- säuren	24
2.7.1. Hybridisierung an immobilisierte DNA	24
2.7.2. Hybridisierung an immobilisierte RNA	25
2.8. Hybridisierung an cDNA-Bibliotheken	25
2.8.1. Art und Herkunft der verwendeten cDNA- Bibliotheken	25
2.8.2. Ausplattieren der cDNA-Bibliotheken und Herstellung von Filterabzügen	26
2.8.3. Plaquehybridisierung und Vereinzelung positiver Klone	27
2.9. DNA-Sequenzierung	27
2.9.1. Sequenzierung von einzelsträngiger M13-DNA	28
2.9.2. Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA	29
2.9.3. Gelelektrophoretische Auftrennung der Sequenzierungsproben und Autoradiografie	30

	Seite
2.9.4. Auswertung der DNA-Sequenzdaten	31
2.10. Fliegenzucht	31
3. <u>Ergebnisse</u>	32
3.1. Charakterisierung der in Speicheldrüsen und Fettkörpern des 3. Häutungsstadiums synthetisierten Transkripte der proximalen DNA aus dem Puff 74EF	32
3.1.1. Zur Analyse eingesetzte DNA	32
3.1.2. Isolierung von RNA	32
3.1.3. Transkriptanalyse mit λ MOT 6-DNA	39
3.1.4. Transkriptanalyse mit λ MOT 4-DNA	46
3.1.5. Transkriptanalyse mit λ MOT 11-DNA	49
3.1.6. Transkriptanalyse mit λ MOT 13-DNA	52
3.1.7. Zusammenfassung der Transkriptanalyse	59
3.2. Isolierung von cDNA-Klonen	62
3.2.1. cDNA-Klone zu Transkript I	62
3.2.2. cDNA-Klone zu Transkript VII und VIII	63
3.2.3. cDNA-Klone zu Transkript VI	66
3.3. Sequenzierung der cDNA-Klone zu Transkript VI und der zugehörigen genomischen DNA	70
3.3.1. Sequenzierung der genomischen DNA von Transkript VI	71
3.3.2. Sequenzierung der Klone c1, c12, c18, c113 und c157	71
3.3.3. Auswertung der Sequenzdaten	84
4. <u>Diskussion</u>	91
5. <u>Zusammenfassung</u>	108
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	109



1. Einleitung

Der Aufklärung von Mechanismen der Genregulation kommt eine wesentliche Bedeutung innerhalb der Molekularbiologie von Eukaryoten zu, bei denen bestimmte Gene in einer festgelegten Reihenfolge zeitlich begrenzt und gewebespezifisch expri-miert oder durch extrazelluläre Einflüsse induziert werden. Obwohl Prokaryoten und Eukaryoten prinzipielle Ähnlichkeiten in der Regulation der Genexpression aufweisen (Ptashne, 1986), reichen die für Prokaryoten aufgestellten Modelle nicht aus, um die komplexe Genregulation von Eukaryoten zu erklären.

In Eukaryoten kann die Genexpression auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Sehr wichtig ist die Kontrolle der Transkription. Aktivierung und Inaktivierung von Genen beinhalten die Wechselwirkung spezifischer Nukleotidsequenzen der DNA (cis-agierende regulatorische Elemente) mit enzymatischen und regulatorischen Proteinen (trans-agierende Faktoren). Auch posttranskriptionale Ereignisse können an der Kontrolle der Genexpression beteiligt sein. Dazu gehören das Prozessieren des Primärtranskripts mit korrektem Entfernen der Introns (Spleißen) und Modifikationen des 5'- und 3'-Endes des Transkripts, der Transport der mRNA ins Cytoplasma, die Halbwertszeit der mRNA, die Translation sowie eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen des entstandenen Polypeptids (Raghow, 1987).

Die Fruchtfliege Drosophila melanogaster stellt ein geeignetes Objekt für Untersuchungen zur Genregulation dar. Aufgrund der frühen Entdeckung der im Lichtmikroskop gut sichtbaren polytären Chromosomen in verschiedenen Geweben des 3. Larvenstadiums (Painter, 1934; Bridges, 1936; Becker, 1959; vgl. Beermann, 1952 (Chironomus tentans)), der Verfügbarkeit natürlich entstandener oder künstlich erzeugter Mutanten und der kurzen Generationszeit der Fliege konnten ausführliche genetische Untersuchungen an diesem Organismus durchgeführt werden. Die Entwicklung der Methoden zur Klonierung und Charakterisierung einzelner Gene führte zur detaillierten Analyse einer großen Anzahl von Drosophila-Genen auf molekularer

Ebene (s. z.B. Cherbas et al., 1986). Das Verfahren der P-Element-Transformation eröffnete die Möglichkeit, genetisch verändertes Erbmateriale in die Keimbahn der Fliege einzubringen und die Wirkung derartiger Veränderungen in vivo zu beobachten (Spradling und Rubin, 1982; Rubin und Spradling, 1982).

Viele Untersuchungen zur Genregulation beschäftigen sich mit zwei Differenzierungs- bzw. Entwicklungsabschnitten von *Drosophila*, und zwar der Embryogenese und der Metamorphose.

Bisher konnten mehrere Gruppen hierarchisch zusammenwirkender Gene lokalisiert werden, die während der Embryogenese Reihenfolge und zeitlichen Ablauf bestimmter Differenzierungsereignisse festlegen und somit den Bauplan des entstehenden Insekts in der befruchteten Eizelle determinieren (Mahowald und Hardy, 1985; Gehring und Hiromi, 1986). Aus diesen Experimenten abgeleitete Erkenntnisse können auch für das Verständnis der Genregulation und Zelldifferenzierung bei höheren Organismen, z.B. Säugern, von Bedeutung sein, da zu einigen der erwähnten *Drosophila*-Gene partiell homologe und möglicherweise funktionell verwandte Gene, u.a. aus Mäusen und Menschen, isoliert werden konnten (Joyner et al., 1985; Dony und Gruss, 1987; Regulski et al., 1987; Rijsewijk et al., 1987).

Die Metamorphose, d.h. die Umwandlung der Insektenlarve über ein Puppenstadium zum adulten Tier, wird durch einen starken Anstieg des Ecdysteroidtiters am Ende des letzten Häutungsstadiums eingeleitet (Richards, 1981). Die Wirkung des Steroidhormons auf die Aktivität bestimmter Gene kann an den polytären Chromosomen beobachtet werden, die im 3. Häutungsstadium u.a. in Speicheldrüsen und Fettkörpern vorhanden sind. Durch starke lokale Dekondensation einzelner Chromosomenabschnitte entstehen sogenannte Puffs, sichtbare Anzeichen für erhöhte Genaktivität (Beermann, 1956). Durch Untersuchungen an Speicheldrüsenchromosomen konnte eine koordinierte und sequenzielle Abfolge von Dekondensation und Regression der Puffs ermittelt werden, die zur Einteilung in 21 aufeinander folgende Puffstadien (PS) führte (Ashburner, 1972). In vitro läßt sich diese Entwicklung durch Inkubation des Gewebes mit

β -Ecdyson in einem geeigneten Kulturmedium bis zu PS 14 nachvollziehen. Die Puffs larvaler Speicheldrüsenchromosomen können aufgrund ihres Verhaltens bezüglich der Hormonzunahme, des zeitlichen Verlaufs ihrer Aktivität und der Abhängigkeit bzw. Unabhängigkeit von der Proteinbiosynthese in drei Gruppen eingeteilt werden: Zwischenhäutungspuffs, frühe Puffs und späte Puffs. Die Abfolge des Puffmusters polytärer Fettkörperchromosomen nach Einwirkung von Ecdysteroiden ist der in Speicheldrüsen teilweise ähnlich, aber nicht mit dieser identisch. Die beschriebenen Puffzyklen sind bei Ashburner und Richards ausführlich dargestellt (Ashburner, 1972, 1973, 1974; Ashburner und Richards, 1976; Richards, 1982).

Mit den aus in vivo-Beobachtungen und in vitro-Inkubationen von Speicheldrüsen mit β -Ecdyson abgeleiteten Ergebnissen konnte ein Modell für die Wirkung des Steroidhormons auf die Puffabfolge und die Aktivität bestimmter Gene abgeleitet werden (Ashburner et al., 1974). Der direkte Nachweis der sequenziellen Bindung von Ecdysteroiden an gepuffte Loci (Gronemeyer und Pongs, 1980; Dworniczak et al., 1983) sowie Untersuchungen des Ecdysteroid-Rezeptor-Komplexes (Schaltmann und Pongs, 1982) führte zu folgender Modifikation des ursprünglich aufgestellten Modells: Das Ecdysteroid bindet reversibel an ein Rezeptor-Protein, worauf der Hormon-Rezeptor-Komplex die frühen Puffs induziert, d.h. die Transkription von Genen dieser Loci aktiviert. Dieser Vorgang ist von der Proteinbiosynthese unabhängig. Mit ansteigender Konzentration von Genprodukten früher Puffs üben diese eine hemmende Wirkung auf die Hormon-Bindung an frühe Puffs aus, die daraufhin reprimiert werden. Gleichzeitig ermöglichen die Genprodukte der frühen Puffs die Hormon-Bindung an die Loci der späten Puffs, die dadurch induziert werden. Die Inhibierung der Proteinbiosynthese verhindert die Regression einiger Zwischenhäutungspuffs und der frühen Puffs sowie die Induktion der späten Puffs.

In dieser verallgemeinerten Form bietet das Modell einen Ansatzpunkt zu Experimenten auf molekularer Ebene, die sich mit der Regulation individueller Gene und der Wechselwirkung ihrer Genprodukte innerhalb des Puffzyklus befassen.

Das Modell wird künftig gewiß verändert und erweitert werden müssen, sobald mehr Daten von Genen einzelner Puffs zur Verfügung stehen.

Während Gene und Genprodukte aus Zwischenhäutungspuffs z.T. schon recht ausführlich untersucht sind, liegen bis jetzt nur wenige Informationen zu frühen ecdysteroidinduzierten Puffs vor. Deshalb werden mit dem Projekt, in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, die Puffs 74EF und 75B untersucht. Sie gehören zu den frühen Puffs, die innerhalb weniger Minuten nach Anstieg des Hormontiters induziert werden und ihr Maximum nach ca. 4 Stunden erreichen. Ihre Regression ist - im Gegensatz zur Induktion - von der Proteinbiosynthese abhängig. In Vorpuppen werden diese Puffs erneut in Abhängigkeit von Ecdysteroiden induziert (Richards, 1976). In larvalen Fettkörperchromosomen entstehen die beiden Puffs ebenfalls nach Einwirkung von Ecdysteroiden. Jedoch bleiben sie - im Gegensatz zu den in Speicheldrüsenchromosomen beobachteten Puffs - bis zum Beginn der Verpuppung bestehen (Richards, 1982). Experimente mit Gendosismutanten dieser Region auf dem Chromosomenarm 3L lieferten einen weiteren Hinweis darauf, daß Genprodukten beider Puffs eine Kontrollfunktion innerhalb des Puffzyklus zukommt (Walker und Ashburner, 1981). Andererseits werden diese Puffs nicht nur durch Ecdysteroiden, sondern auch durch bis jetzt noch nicht identifizierte Genprodukte eines anderen frühen ecdysteroidinduzierten Puffs, 2B5, beeinflußt. Homozygote oder hemizygote Larven der Mutante l(1)t435 sterben gegen Ende des 3. Larvenstadiums, ohne sich zu verpuppen. In vivo treten bei Speicheldrüsenchromosomen nur Zwischenhäutungspuffs auf. Bei in vitro mit β -Ecdyson inkubierten Speicheldrüsen werden hingegen einige frühe Puffs, u.a. 74EF und 75B, nur zu 30 bis 40 % ihrer in Wildtyp-Larven vorkommenden Größe induziert. Die Ausbildung der späten Puffs unterbleibt (Belyaeva et al., 1981). Diese genetischen Daten weisen auf eine komplexe Verflechtung der an der Regulation des Puffzyklus beteiligten Gene hin. Da keine Mutanten der Loci 74EF und 75B zur Verfügung stehen, wurde mittels Mikrodisektion und -klonierung sowie "Wanderung auf dem Chromosom" genom-

sche DNA der beiden Puffs isoliert, um die in ihr codierten Gene näher untersuchen zu können (Möritz et al., 1984; Möritz, 1985; Rentrop, 1984; Lüdecke, 1985; Gram, 1986). Parallel zu Experimenten mit DNA des Puffs 75B (Gram, 1986) und DNA des distalen Bereichs von 74EF (Lüdecke, 1985) wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der proximale Bereich der isolierten DNA von 74EF einer Transkriptanalyse unterzogen, um die in dieser Region codierten Gene zu charakterisieren und deren Hormonregulation und Gewebespezifität zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Herkunft der λ -Phagen mit insertierter genomischer DNA aus dem Locus 74EF von *D. melanogaster*

Die in dieser Arbeit bezüglich der Transkription charakterisierte genomische DNA stammt aus einer "Wanderung auf dem Chromosom", die von T. Möritz, M. Rentrop und H.-J. Lüdecke unternommen wurde (Möritz et al., 1984; Möritz, 1985; Rentrop, 1984; H.-J. Lüdecke, 1985). Die gesamte aus dem Locus 74EF isolierte Region erstreckt sich über ca. 135 kBp genomischer DNA, die als λ -Klone der Vektoren Charon 4A (Maniatis, 1978) bzw. EMBL 4A (Preiss et al., 1985) vorliegt. In dieser Arbeit wurde die insertierte DNA der Phagen λ MOT 13, 6, 4 (EMBL 4A) und λ MOT 11 (Charon 4A) näher untersucht. Die DNA umfaßt ca. 57 kBp.

2.2. Isolierung von DNA

2.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde in dem *E. coli*-Stamm C600 (hsdR⁻, hsdM⁺, supE, thr, leu, thi, lacY1, tonA21) (Appleyard, 1954) vermehrt. Die Anzucht plasmidtragender Bakterien erfolgte in LB-Medium (Benton und Davis, 1977) mit zugesetztem Ampicillin (Maniatis et al., 1982).

LB-Medium:

10 g Bacto-Pepton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
ad 1000 ml H₂O

Nach Lösen der angegebenen Substanzen wurden der pH-Wert 7,5 mit NaOH eingestellt und die Lösung autoklaviert. Vor Verwendung des Mediums wurde Ampicillin bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml Medium aus einer in 1 M Tris-HCl, pH 7,9, angesetzten Stammlösung zugefügt.

LB-Platten enthielten 15 g/l Bacto-Agar.

2.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus 2 ml-Kulturen

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurden 2 ml LB-Medium mit Ampicillin (s. 2.2.1.) mit einer das gewünschte Plasmid enthaltenden Bakterienkolonie angeimpft und mindestens 7 Stunden bei 37°C im Schüttler (170 rpm) inkubiert. Die Aufarbeitung von 1,5 ml einer solchen Kultur erfolgte mittels alkalischer Lyse (s. Maniatis et al., 1982; Birnboim und Doly, 1979). Nach Lösen der isolierten DNA in 20 µl TE wurden 4 bis 8 µl davon zur Restriktion eingesetzt.

TE:

10 mM Tris-HCl, pH 7,9

1 mM EDTA

2.2.1.2. Präparative Plasmid-Isolierung

Plasmid-DNA wurde in präparativem Maßstab isoliert, wenn größere Mengen benötigt wurden oder eine höhere Reinheit der DNA erforderlich war, die bei der Aufarbeitung von 2 ml-Kulturen nach oben beschriebenen Verfahren nicht zu erzielen ist.

500 ml LB-Medium mit Ampicillin (s. 2.2.1.) wurden 1:100 mit einer über Tag gezogenen Bakterienkultur, die das gewünschte Plasmid enthielt, angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler (170 rpm) inkubiert. Die Aufarbeitung der Bakterien erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) mit den bei Maniatis et al. beschriebenen Modifikationen. Die isolierte DNA wurde durch eine CsCl-Ethidiumbromid-Gleichgewichtszentrifugation gereinigt, um

kontaminierende bakterielle DNA, Plasmid-DNA mit Doppel- oder Einzelstrangbrüchen, RNA und Proteine abzutrennen (Maniatis et al., 1982). Die Ausbeuten betrugen 0,4 bis 1 mg DNA pro 500 ml-Kultur.

2.2.2. Isolierung von DNA aus M13-Phagen

M13-Phagen wurden in dem E. coli-Stamm JM103 (Δ lacpro, supE, thi, strA, sbcB15, endA, hsdR4, F' traD36, proAB, lacI^q Z M15) (Messing, 1983) gezogen. Die zum Animpfen der Kulturen dienenden Bakterien wurden auf M9-Platten mit Thiamin gehalten.

M9-Medium:

6 g Na₂HPO₄
3 g KH₂PO₄
0,5 g NaCl
1 g NH₄Cl
ad 1000 ml H₂O

Nach Lösen der Salze wurden der pH-Wert auf 7,5 eingestellt, die Lösung autoklaviert und anschließend folgende Substanzen, zuvor getrennt autoklaviert bzw. sterilfiltriert, zugefügt:

2 ml 1 M MgSO₄
10 ml 20 %ige Glukoselösung
0,1 ml 1 M CaCl₂
1 ml 2,5 %ige Thiamin-HCl-Lösung

M9-Platten enthielten 15 g/l Bacto-Agar (Maniatis et al., 1982).

2.2.2.1. Isolierung doppelsträngiger DNA der replikativen Form (RF-DNA) von M13

Eine präparative RF-DNA-Isolierung wurde bei Bedarf größerer Mengen eines bestimmten M13-Subklons oder von M13-Vektor-DNA durchgeführt.

500 ml LB-Medium (s. 2.2.1.) wurden 1:100 mit einer logarithmisch wachsenden JM103-Kultur angeimpft und im Schüttler bei 37°C inkubiert. War eine Absorption von 0,6 bei 578 nm Wellenlänge erreicht, wurden die Bakterien mit M13-Phagen im Verhältnis 5:1 bis 10:1 infiziert und weitere 2,5 Stunden im Schüttler inkubiert (Messing, 1983). Die Bakterien wurden, wie in 2.2.1.2. beschrieben, analog zur präparativen Plasmid-Isolierung aufgearbeitet. Die Ausbeuten betrugen 200 bis 300 µg DNA pro 500 ml-Kultur.

Zur Überprüfung von Klonierungen wurde RF-DNA in kleinem Maßstab isoliert.

2 ml LB-Medium wurden 1:100 mit einer logarithmisch wachsenden JM103-Kultur angeimpft. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde ein Plaque des gewünschten Klons ausgestochen und zur Kultur gegeben. Nach mindestens siebenständiger Inkubation im Schüttler bei 37°C erfolgte die Aufarbeitung der RF-DNA, wie in 2.2.1.1. beschrieben, analog zur Isolierung von Plasmid-DNA.

2.2.2.2. Isolierung von Einzelstrang-DNA

Aus den in 2.2.2.1. geschilderten 2 ml-Kulturen konnte auch die Einzelstrang-DNA der Phagen isoliert werden, die u.a. bei der Sequenzierung (s. 2.9.) eingesetzt wurde (Messing, 1983).

1,3 ml des nach Pelletieren der Bakterien erhaltenen Überstands wurden mit 150 µl PEG-Lösung 60 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur (12.000 g) wurde das Phagenpellet in 100 µl TE (s. 2.2.1.1.) aufgenommen und je einmal mit Phenol und Chloroform extrahiert. Die isolierte DNA wurde mit Ethanol gefällt und in 15 µl TE aufgenommen.

PEG-Lösung:

20 g PEG 6000

14,6 g NaCl

ad 100 ml H₂O

Die Lösung wurde autoklaviert.

2.2.3. Isolierung von λ -DNA (Minipräparation)

Ein Plaque des gewünschten λ -Phagen wurde mit einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen und mindestens 30 Minuten in 1 ml SM bei Raumtemperatur eluiert. 10 bis 30 μ l Phageneluat wurden mit 300 μ l einer stationären Bakterienkultur des entsprechenden E. coli-Stammes und 300 μ l SM 20 Minuten bei 37°C zur Präadsorption inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 5 ml LB-Medium (s. 2.2.1.) mit 10 mM MgCl₂ wurde die Kultur mindestens 7 Stunden bei 37°C geschüttelt. Die Aufarbeitung der λ -DNA erfolgte im wesentlichen wie bei Maniatis et al. beschrieben, mit der Ausnahme, daß anstelle der angegebenen Isopropanol-Fällung eine Ethanol-Fällung durchgeführt wurde (Maniatis et al., 1982). λ -DNA aus einer solchen Minipräparation wurde in 20 μ l TE (s.2.2.1.2.) aufgenommen. Zur Restriktion wurden 4 bis 10 μ l eingesetzt (s.2.3.1.).

SM:

100 mM NaCl

10 mM Tris-HCl, pH 7,4

10 mM CaCl₂

10 mM MgCl₂

0,05 % Gelatine

2.2.4. Isolierung von DNA aus D. melanogaster

Die Präparation gesamtgenomischer Drosophila-DNA aus adulten Tieren erfolgte, wie bei Baumann beschrieben (Baumann, 1986; Brennan et al., 1984).

2.3. Subklonierung

2.3.1. Restriktion und elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten auf Agarosegelen

1 bis 3 µg DNA wurden mit der entsprechenden Menge des gewählten Restriktionsenzym in einem Endvolumen von 15 bis 20 µl verdaut. Da alle verwendeten Restriktionsenzyme bis auf Sma I und Sal I zufriedenstellend in "core"-Puffer (BRL, Eggenstein) arbeiteten, konnten Doppelverdauungen mit zwei Enzymen gleichzeitig durchgeführt werden. Bei den beiden genannten Enzymen wurde der vom jeweiligen Hersteller empfohlene Restriktionspuffer verwendet. Nach mindestens 60 Minuten Inkubation bei 37°C (Taq I: 65°C, Sma I: 30°C) wurde der Restriktionsansatz mit 5 µl Probenpuffer versetzt. Bei der Verdauung von λ-DNA wurde anschließend 5 Minuten auf 65°C erhitzt, um die kohäsiven Enden der DNA aufzuschmelzen. Die so erhaltenen Proben konnten direkt zur Gelelektrophorese eingesetzt werden.

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden horizontale Gele (8 cm x 12 cm) mit 0,6 bis 2 % (w/v) Agarose in TEB bzw. niedrig-schmelzender Agarose in TEA benutzt. Die Gellösungen enthielten 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Die Elektrophorese erfolgte in TEB als Laufpuffer bei einer Spannung von 150 bis 200 V. Die Auftrennung von Fragmenten in Gelen aus niedrig-schmelzender Agarose wurde bei 4°C mit TEA als Laufpuffer durchgeführt. Dabei betrug die Spannung während der Elektrophorese maximal 120 V.

10x Core-Puffer:

500 mM Tris-HCl, pH 7,9
500 mM NaCl
100 mM MgCl₂

Probenpuffer:

0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylencyanol
25 % Ficoll 400
in H₂O

TEB:

0,089 M Tris-Borat
0,089 M Borsäure
0,002 M EDTA

TEA:

0,04 M Tris-HCl
0.02 M Natriumacetat
0,002 M EDTA

2.3.2. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, die zur radioaktiven Markierung durch "Nick-Translation", Ligation oder Restriktion eingesetzt werden sollten, wurden mit Hilfe der "Freeze-Squeeze"-Methode aus Agarosegelen eluiert (s. 2.3.1, 2.3.4, 2.6.1)(Tautz und Rentz, 1983). Bei sehr geringen DNA-Konzentrationen wurde zu der abschließenden Ethanol-Fällung Glycogen als Carrier eingesetzt.

Wenn größere Mengen an DNA-Fragment benötigt wurden, erfolgte die Auftrennung eines entsprechend großen Restriktionsansatzes auf der ganzen Breite eines Gels. Das Fragment wurde mit Hilfe von DEAE-(Diethylaminoethyl-)Papier aus dem Gel eluiert (Möriz, 1985).

Beide Verfahren lieferten Ausbeuten von 60 bis 70 %.

2.3.3. Präparation von Vektor-DNA

DNA-Fragmente, die sequenziert werden sollten, wurden in die M13-Vektoren M13mp8, 9, 10, 18 oder 19 kloniert (Messing, 1983; Yanish-Perron et al., 1985). War eine Sequenzierung doppelsträngiger DNA erforderlich, wurden die Plasmide Bluescript (Stratagene, San Diego) und pAT153 (Twigg und Sherratt, 1980) zur Klonierung gewählt, bei beabsichtigter in vitro-Transkription die Vektoren pSPT18 und 19 (Pharmacia, Freiburg).

5 µg präparativ isolierter Vektor-DNA (s. 2.2.1.2.) wurden mit dem oder den erforderlichen Restriktionsenzymen verdaut (s. 2.3.1.). Da eine spätere Religation einfach restringierter Vektoren verhindert werden sollte, wurde eine Dephosphorylierung zum Entfernen der endständigen 5'-Phosphatgruppen durchgeführt. Ca. 20 Minuten vor Beendigung der Restriktion

wurde eine Einheit alkalischer Phosphatase (aus Kälberdarm) pro pmol Enden geschnittener DNA zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz mit EGTA (Endkonzentration 20 mM) versetzt und 10 Minuten auf 65°C erhitzt. Nach zweimaliger Phenol- und Chloroformextraktion wurde die DNA durch Ethanol gefällt und mit einer Konzentration von 50 ng/µl in TE (s. 2.2.1.1.) aufgenommen. Die Vollständigkeit der Restriktion und Dephosphorylierung wurde überprüft, indem kompetente Bakterien des entsprechenden Stamms mit linearisierter und dephosphorylierter bzw. religierter Vektor-DNA transformiert wurden.

2.3.4. Herstellung kompetenter Bakterien, Ligation und Transformation

Die Herstellung kompetenter Bakterien erfolgte nach der CaCl₂-Methode, wie bei Maniatis et al. beschrieben (Maniatis et al., 1982). Lediglich die angegebene 12- bis 24-stündige Inkubation der Bakterien bei 4°C entfiel. Die Bakterien wurden mit 20 % (v/v) Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sie konnten anschließend mehrere Wochen bei -70°C gelagert werden. Die Transformationseffizienz lag zwischen 5×10^5 und 1×10^6 Transformanten pro µg eingesetzter DNA.

Zur Ligation wurden 50 ng linearisierte und dephosphorylierte Vektor-DNA (s. 2.2.3.) mit einem zwei- bis dreifachen molaren Überschuß zu insertierenden Fragments versetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 20 µl mit ein bis zwei Einheiten T4-DNA-Ligase bei 16°C in dem vom Hersteller des Enzyms angegebenen Puffer. Nach mindestens 4 Stunden wurde der Ansatz 5 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend zur Transformation eingesetzt.

Manchmal war die Entfernung eines Teils des insertierten Fragments aus einem Klon unter Ausnutzung einer in diesem und in der multiplen Klonierungsregion des Vektors singulären Restriktionsschnittstelle möglich. Dazu wurde die restringierte DNA auf einem Gel aus niedrig-schmelzender Agarose aufgetrennt. Die Bande, die die Vektor-DNA mit dem ver-

bliebenen Teil des Fragments enthielt, wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Die Religation erfolgte nach Aufschmelzen der Agarose (10 Minuten, 65°C; 5 Minuten 37°C) sowie Zugabe von Puffer und Enzym bei Raumtemperatur.

Bei der Transformation mit M13-DNA wurden 200 µl kompetente Bakterien (JM103) zu dem Ligationsansatz gegeben und 45 Minuten auf Eis inkubiert. Diese Suspension wurde halbiert und mit jeweils 30 µl IPTG- und X-Gal-Lösung sowie 50 µl logarithmisch wachsender Bakterien (JM103) versetzt. Das Ausplattieren fand auf LB-Platten (s. 2.2.1.) mit je 3 ml Weichagar statt. Die Platten wurden 12 bis 16 Stunden bei 37°C bebrütet. Mit dieser Methode wurden auch Transformationen mit einzelsträngiger M13-DNA durchgeführt (Messing, 1983).

Bei Plasmid-DNA erfolgte die Transformation von 200 µl kompetenten Bakterien (C800) mit dem Ligationsansatz 30 Minuten bei 0°C und 5 Minuten bei 37°C. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (s. 2.2.1.) wurde die Suspension 25 Minuten bei 37°C im Schüttler (120 rpm) inkubiert. Der Ansatz wurde auf zwei LB-Platten mit Ampicillin (s. 2.2.1.) verteilt. Die Platten wurden 12 bis 16 Stunden bei 37°C bebrütet (Maniatis et al., 1982).

Weichagar:

10 g Bacto-Pepton
0,5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
7 g Bakto-Agar
ad 1000 ml H₂O

IPTG-Lösung: 25 mg/ml in H₂O

X-Gal-Lösung: 20 mg/ml in Dimethylformamid

2.4. Isolierung von RNA

2.4.1. Isolierung von RNA der verschiedenen Entwicklungsstadien von *D. melanogaster*

Um möglichst sich synchron entwickelnde Populationen von *D. melanogaster* zu erhalten, wurden nach einstündiger Vorablage jeweils eine Stunde lang Embryonen gesammelt und auf Nährmedium (s. 2.10.) ausgestrichen (Vincent et al., 1984). Die Anzucht erfolgte bei 25°C, 70 % relativer Luftfeuchtigkeit und ausreichender Fütterung mit aktiver Hefe.

Im 3. Häutungsstadium wurde der jeweilige Entwicklungszustand einer Larvenpopulation durch Stichproben überprüft, indem bei mehreren Tieren das Puffmuster der Speicheldrüsenchromosomen mit Hilfe von Quetschpräparaten bestimmt wurde (Pardue und Gall, 1975). Als "Intermolt"-Larven wurden Tiere unmittelbar nach der Häutung im PS 1 bezeichnet. "Frühe" Larven befanden sich in den Puffstadien 3 bis 6, "späte" Larven mindestens im PS 8.

Hatten die Tiere das gewünschte Entwicklungsstadium erreicht (vgl. Koerwer, 1983), wurden sie abgesammelt und mehrmals mit eiskaltem PBS gewaschen. Je 3 g wurden mit 12 ml Guanidinpuffer versetzt und 3 Minuten (6 x 30 Sekunden mit je 30 Sekunden Unterbrechung) im Ultra-Turrax (Ika-Werke) bei Raumtemperatur homogenisiert. Nach dreimaliger Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die Lösung auf ein Kissen aus 5,7 M CsCl in 100 mM EDTA geschichtet und zur Abtrennung der DNA bei 100.000 g (SW 65, 22°C, 14 Stunden) zentrifugiert. Die pelletierte RNA wurde in 0,1 % SDS aufgenommen und bei - 20°C gelagert (Harding et al., 1978).

PBS:

150 mM NaCl
2 mM KH₂PO₄
8 mM Na₂HPO₄

Guanidinpuffer:

5 M Guanidinthiocyanat
2 % Sarkosyl
5 % β -Mercaptoethanol
50 mM EDTA
50 mM Tris-HCl, pH 7,8

2.4.2. Isolierung von RNA aus Larvengewebe

2.4.2.1. In vitro-Inkubation von Speicheldrüsen und Fettkörpergewebe

Wenn Speicheldrüsen und Fettkörpergewebe aus Larven im dritten Häutungsstadium isoliert werden sollten, wurden zunächst alle schon an der Wand des Zuchtgefäßes kletternden Larven entfernt. Von den Tieren, die im Verlauf der nächsten Stunde das Nährmedium verließen, wurde stichprobenartig das Puffstadium der Speicheldrüsenchromosomen durch Quetschpräparate überprüft (Pardue und Gall, 1975), um sicherzustellen, daß nur Larven im Puffstadium 1 verwendet wurden (Ashburner, 1972).

Speicheldrüsen und Fettkörpergewebe wurden in eiskaltem, 5:1 mit Wasser verdünntem Grace's Medium aus den Larven seziiert (Grace, 1962). Jeweils 50 bis 70 Speicheldrüsenpaare bzw. Fettkörper aus ca. 50 Tieren wurden mit β -Ecdyson (Endkonzentration: 5×10^{-6} M) 1 bis 10 Stunden inkubiert. Die Inkubation fand mit verdünntem Grace's Medium in einem Volumen von 200 μ l bei 25°C in einer feuchten Kammer statt. Anschließend wurden von zwei bis drei Speicheldrüsen Quetschpräparate angefertigt, um anhand des Puffmusters die Hormoninduktion zu überprüfen. Danach wurden die Speicheldrüsen in ein in Trockeneis stehendes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur Aufarbeitung der RNA bei -70°C gelagert. Die RNA aus Fettkörpergewebe wurde sofort nach der Inkubation isoliert.

Als Kontrollproben wurden Speicheldrüsen direkt nach dem Sezieren eingefroren bzw. Fettkörpergewebe sofort aufgearbeitet ("0 Stunden"-Inkubationen, PS 1). Als weitere Kontrolle wurde RNA aus Speicheldrüsen isoliert, die 1 bzw. 4 Stunden ohne zugesetztes Hormon unter ansonsten identischen Bedingungen inkubiert worden waren.

Bei der gewählten Hormonkonzentration konnte die in vivo beobachtete Puffabfolge in vitro nachvollzogen werden (Ashburner, 1973). Einigen Inkubationen (6 Stunden) wurde neben

β -Ecdyson auch Cycloheximid als Inhibitor der Proteinbiosynthese zugesetzt (Endkonzentration: 7×10^{-4} M). Dadurch lassen sich Speicheldrüsen für mehrere Stunden in PS 4 fixieren. Dabei wird die bis dahin synthetisierte RNA, u.a. auch die RNA der frühen ecdysteroidinduzierten Gene, stabilisiert und angereichert (Ashburner, 1974).

Im Verlauf der Experimente stellte sich heraus, daß die Ausbeute an intakter RNA am größten war, wenn Speicheldrüsen mit heißem Phenol und Tris-SDS-Puffer aufgeschlossen wurden, Fettkörpergewebe dagegen mit Guanidinthiocyanat. Inkubiertes Fettkörpergewebe einzufrieren und erst später aufzuarbeiten, war nicht möglich.

2.4.2.2. Isolierung von RNA aus Speicheldrüsen mit heißem Phenol

Die eingefrorenen Speicheldrüsen wurden in 200 μ l einer auf 65°C vorgewärmten 1:1-Mischung aus Tris-SDS-Puffer und TE-gesättigtem Phenol bei 65°C homogenisiert (TE: s. 2.2.1.1.). Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase dreimal mit Phenol bei 65°C und einmal mit Chloroform extrahiert. Die RNA wurde durch Zugabe von 2,5 Volumina Ethanol bei -20°C gefällt, durch Zentrifugation pelletiert und einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknen des Pellets wurde die RNA in 0,1 % SDS aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 600 ng RNA pro Speicheldrüsenpaar. Die DNA-Kontamination der isolierten RNA wurde auf weniger als 5 % geschätzt (vgl. Dingmann und Sporn, 1962).

Tris-SDS-Puffer:

100 mM Tris-HCl, pH 9,0

100 mM NaCl

1 % SDS

2.4.2.3. Isolierung von RNA aus Fettkörpergewebe mit Guanidinthiocyanat

Fettkörpergewebe aus ca. 50 Tieren wurde, wie in 2.4.2.1. beschrieben, in 200 µl Lösung inkubiert. Nach Zugabe von 2,5 Volumina Guanidinpuffer (auf 65°C vorgewärmt, s. 2.4.1.) wurde das Gewebe bei 65°C homogenisiert (vgl. Feramisco et al., 1982). Wenn keine Gewebestücke mehr sichtbar waren, wurden 100 µl 0,5 M Natriumacetat, pH 5,5, zugefügt und drei Phenolextraktionen bei 65°C und eine Chloroformextraktion durchgeführt. Die RNA wurde wie in 2.4.2.2. gefällt und in 0,1 % SDS aufgenommen.

Die Ausbeuten an RNA waren unterschiedlich, da das Gewebe oftmals nicht vollständig aus einer Larve entfernt werden konnte. Es wurden jedoch mindestens 3 µg RNA pro Larve isoliert.

2.4.3. Isolierung polyadenylierter RNA

Polyadenylierte RNA wurde durch Affinitätschromatografie mit Oligo(dT)-Cellulose isoliert (Aviv und Leder, 1972). Die Versuchsdurchführung entsprach der bei Maniatis et al. beschriebenen mit den dort angegebenen Puffern (Maniatis et al., 1982).

2.4.4. Elektrophoretische Auftrennung von RNA auf denaturierenden Agarosegelen

2.4.4.1. Agarosegele mit Methylquecksilberhydroxid

Die Qualität der RNA in Bezug auf Größe und Menge wurde mit denaturierenden horizontalen Agarosegelen (11 cm x 14 cm) überprüft. Als denaturierendes Agens wurde Methylquecksilberhydroxid verwendet, das wegen seiner Toxizität nur im Puffer, nicht aber in der Gellösung eingesetzt wurde (Bailey und Davidson, 1976).

Die RNA konnte auch in geringen Mengen (0,5 µg) in Gelen mit CH₃HgOH nachgewiesen werden, während bei Formaldehyd-Gelen

eine deutliche Anfärbung erst ab 1,5 bis 2 µg RNA pro Gelbahn erzielt wurde.

1 bis 2 µg in 0,1 % SDS gelöster RNA wurden mit einem Volumen 2x Probenpuffer versetzt und auf 0,9 %igen Agarosegelen in Boratpuffer, der auch als Laufpuffer diente, aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte 30 Minuten bei 50 V und ca. 3 Stunden bei 100 V. In regelmäßigen Abständen wurde der Laufpuffer in der Elektrophoresekammer durchmischt, um die Ausbildung eines pH-Gradienten zu verhindern. Anschließend wurde das Gel 30 Minuten in Färbelösung und 20 Minuten in Wasser gelegt, um die RNA durch Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar zu machen.

Als Molekulargewichtsstandards dienten poly(A⁻)-RNA von HeLa-Zellen (28 S und 18 S) und ribosomale RNA von E. coli (23 S und 16 S) (Carmichael und McMaster, 1980; Wellauer und Dawid, 1973).

Boratpuffer:

50 mM Borsäure
5 mM Natriumborat
10 mM Natriumsulfat

2x Probenpuffer:

25 mM CH₃HgOH
20 % Glycerin
0,05 % Bromphenolblau
0,05 % Xylencyanol
2 x Boratpuffer

Färbelösung:

0,5 M Ammoniumacetat
1 µg/ml Ethidiumbromid

2.4.4.2. Agarosegele mit Formaldehyd

Agarosegele mit Formaldehyd wurden benutzt, wenn die RNA nach der Elektrophorese auf Nylonmembran transferiert werden sollte (s. 2.5.2.) (vgl. Lehrach et al., 1977; Goldberg, 1980).

10 µg Gesamt-RNA bzw. 2 µg poly(A⁺)-RNA wurden mit einem Volumen 2x Probenpuffer zur Denaturierung 5 Minuten auf 55°C erhitzt und auf 0,9 %igen Agarosegelen mit 2,2 M Formaldehyd in MOPS-Puffer aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde ebenfalls MOPS-Puffer verwendet. Nach 30 Minuten Elektrophorese bei 50 V und drei bis vier Stunden bei 120 V wurden die Gelbahnen mit den Molekulargewichtsstandards abgetrennt, gefärbt und fotografiert (s. 2.4.4.2.).

MOPS-Puffer:

2x Probenpuffer:

20 mM MOPS	50	% Formamid (deionisiert,
5 mM Natriumacetat		umkristallisiert)
1 mM EDTA	2,2	M Formaldehyd
	0,05	% Bromphenolblau
	0,05	% Xylencyanol
	2	x MOPS-Puffer

2.5. Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Nukleinsäuren wurden auf die Nylonmembranen Biodyne A, Porengröße 0,2 µm (Pall, Dreieich), und Hybond N, Porengröße 0,45 µm (Amersham Buchler, Braunschweig), transferiert.

2.5.1. Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente auf Nylonmembranen (Southern-Transfer)

Agarosegele wurden nach der Elektrophorese fotografiert und je 20 Minuten mit Denaturierungs- und Neutralisierungslösung behandelt. Die Überführung der DNA auf die Nylonmembran erfolgte mit 20x SSC als Laufmittel, wie bei Southern beschrieben (Southern, 1975). Nach frühestens 4 Stunden wurden die Nylonmembran an der Luft getrocknet und die DNA durch einständiges Backen bei 80°C im Vakuum an die Membran gebunden.

Denaturierungslösung:

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Neutralisierungslösung:

3 M Natriumacetat, pH 5,5

20x SSC:

3 M Natriumchlorid
0,3 M Natriumzitat

2.5.2. Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA auf
Nylonmembranen (Northern-Transfer)

RNA wurde nach Auftrennung auf Formaldehyd-Agarosegelen (s. 2.4.4.2.) elektrophoretisch auf Nylonmembranen transferiert. Vorversuche hatten ergeben, daß mit dieser Methode größere Transfereffizienz und bessere Fixierung der RNA an die Membran erzielt werden konnten als bei dem in 2.5.1. beschriebenen Transfer durch Diffusion.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel kurz mit bidestilliertem Wasser abgespült und 10 Minuten in Transfer-Puffer äquilibriert. Die elektrophoretische Überführung der RNA auf die Membran erfolgte unter Eiskühlung 1 Stunde bei 40 V und 4 Stunden bei 90 V. Der Aufbau der handelsüblichen Kammer (Bio-Rad, München) ist von Dahlberg und Stellwag ausführlich beschrieben worden (Dahlberg und Stellwag, 1983). Anschließend wurde die Membran wie in 2.5.1. weiterbehandelt.

Transfer-Puffer:

3 mM Zitronensäure
3,8 mM Dinatriumhydrogenphosphat

2.6. Herstellung radioaktiv markierter Proben

2.6.1. Herstellung radioaktiv markierter DNA durch "Nick-Translation"

Bei der radioaktiven Markierung von DNA, die in Plasmide oder in M13 kloniert war bzw. als isoliertes Fragment vorlag, wurden jeweils 100 ng DNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz mit einem Volumen von 20 μ l hatte folgende Zusammensetzung (vgl. Rigby et al., 1977):

je	0,15 mM	dGTP, dCTP, dTTP bei Markierungen mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP bzw. dGTP, dATP, dTTP bei Markierungen mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP
	50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	DTT
	50 μ g/ml	BSA
	100 ng	DNA
	1.11 MBq	$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP bzw. $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (29,6 TBq/mmol)
	2 ng	DNase I (aus Rinderpankreas)
	3-5	Einheiten DNA-Polymerase I (E. coli)

Nach 45 Minuten bei 16°C wurden die Reaktion durch Zugabe von 20 μ l Stop-Lösung beendet und die freien Nukleotide durch eine Sephadex G100-Chromatografie (2 ml Säulenvolumen) mit 10 mM EDTA als Laufmittel abgetrennt.

Mit dieser Methode wurden spezifische Markierungen von 5×10^7 bis 2×10^8 cpm/ μ g DNA erreicht. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte nach Cerencov (Cerenkov, 1934). Bei der radioaktiven Markierung von λ -Klonen mit insertierter genomischer DNA wurden 400 ng DNA und je 1,85 MBq $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP und $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP mit entsprechender Abwandlung des oben angegebenen Reaktionsansatzes eingesetzt. Die spezifischen Aktivitäten betrugen 1 bis 4×10^8 cpm/ μ g DNA beim Einsatz zweier radioaktiv markierter Nukleotide.

Vor der Hybridisierung wurde die markierte DNA 5 Minuten bei 100°C denaturiert.

Stop-Lösung:

100 mM EDTA
50 % Glycerin
0,1 % Dextranblau

2.6.2. Herstellung radioaktiv markierter RNA durch in vitro-Transkription

DNA, die zur in vitro-Transkription vorgesehen war, wurde in die Vektoren pSPT18 und 19 (Pharmacia, Freiburg) kloniert, bei denen eine multiple Klonierungsstelle einerseits von einem SP6-Promotor und andererseits von einem T7-Promotor entgegengesetzter Orientierung begrenzt wird. Je nachdem, welcher Strang transkribiert werden sollte, wurde die DNA mit einem Restriktionsenzym linearisiert, dessen Schnittstelle vom Promotor aus gesehen hinter dem insertierten Fragment liegt. Die in vitro-Transkription erfolgte mit 1,85 MBq $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP (29,6 TBq/mmol) und 2 μg DNA, wie bei Melton et al. beschrieben (Melton et al., 1984). Lediglich RNasin (RNase-Inhibitor aus menschlicher Plazenta) und SP6- bzw. T7-Polymerase wurden in doppelter Konzentration eingesetzt. Die Abtrennung der freien Nukleotide fand durch mehrmaliges Waschen der pelletierten RNA mit 0,5 M Ammoniumacetat in 75 %igem Ethanol statt. Die Ausbeuten betrugen durchschnittlich 10^8 cpm radioaktiv markierter RNA pro μg eingesetzter DNA.

Die durch in vitro-Transkription erhaltene RNA wurde auf 4 %igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen (s. 2.9.3.) überprüft. Neben RNA, die aus der Transkription des gesamten insertierten Fragments entstanden war, traten auch kürzere RNA-Spezies auf und zwar zum Teil in Form von distinkten Banden, die auf einen vorzeitigen Abbruch der Transkription zurückzuführen waren.

2.7. Hybridisierung an immobilisierte Nukleinsäuren

2.7.1. Hybridisierung an immobilisierte DNA

Nylonmembranen mit transferierten DNA-Fragmenten (s. 2.5.1.) wurden mindestens 2 Stunden bei 65°C in Southern-Hybridisierungslösung vorinkubiert. Die Hybridisierung erfolgte in zugeschweißten Kunststofftüten mit ca. 8 ml Hybridisierungslösung pro 100 cm² Membran für 4 bis 16 Stunden bei 65°C. Die Konzentration der eingesetzten radioaktiv markierten DNA (s. 2.6.1.) betrug 10⁶ bis 10⁷ cpm pro ml Lösung. Im Anschluß an die Hybridisierung wurde die Membran mit 1x SSC, 0,1 % SDS eine Stunde bei 65°C gewaschen (Maniatis et al., 1982). Die Autoradiografie (1 bis 16 Stunden) wurde bei -70°C unter Verwendung von Verstärkerfolie (Cronex Hi-Plus, Du Pont, Dreieich) durchgeführt (Laskey und Mills, 1977). Nach Abwaschen der Hybridisierungsprobe (15 Sekunden in kochendem Wasser) konnte die Membran mehrmals wieder benutzt werden.

Southern-Hybridisierungslösung:

5	x	Denhardt's
4	x	SSC (s. 2.5.1.)
0,1	%	SDS
100	µg/ml	sonifizierte und denaturierte Lachssperma-DNA

50x Denhardt's: (Denhardt, 1966)

10 g Ficoll 400
10 g BSA
10 g Polyvinylpyrrolidon
ad 1000 ml H₂O

Bei immobilisierter gesamtgenomischer DNA aus D. melanogaster (s. 2.2.4.) wurde Hybridisierungslösung verwendet, die 50 % Formamid zusätzlich zu den oben angegebenen Substanzen enthielt. Die Hybridisierung erfolgte nach Vorinkubation über 24 Stunden bei 42°C. Das Waschen der Membran und die

Autoradiografie wurden, wie gerade beschrieben, durchgeführt. Die Expositionszeit der Filme betrug 7 Tage.

2.7.2. Hybridisierung an immobilisierte RNA

Die Hybridisierung an membrangebundene RNA fand nach mindestens zweistündiger Vorhybridisierung in Northern-Hybridisierungslösung statt. Durch "Nick-Translation" radioaktiv markierte DNA (s. 2.6.1.) wurde bei 42°C 24 bis 65 Stunden an die RNA hybridisiert. Bei radioaktiv markierter RNA als Probe, die durch in vitro-Transkription erzeugt worden war (s. 2.6.2.), reichte eine Hybridisierungszeit von 24 Stunden bei 58°C aus.

Menge der eingesetzten radioaktiv markierten Probe, Volumen der Lösung, Waschen der Nylonmembran und Autoradiografie entsprachen den Angaben in 2.7.1..

Die Expositionszeiten betrugen je nach verwendeter Probe und Art der radioaktiven Markierung zwischen einem Tag (in vitro-transkribierte RNA) und sieben Tagen ("nick-translatierte" DNA).

Nach Abwaschen der Hybridisierungsprobe (15 Sekunden in kochendem Wasser) konnte die Membran bis zu dreimal wiederverwendet werden.

Northern-Hybridisierungslösung:

50	%	Formamid (deionisiert, umkristallisiert)
5	x	Denhardt's (s. 2.7.1.)
5	x	SSC (s. 2.5.1.)
0,1	%	SDS
50	mM	Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,5
1	mg/ml	sonifizierte und denaturierte Lachssperma-DNA

2.8. Hybridisierung an cDNA-Bibliotheken

2.8.1. Art und Herkunft der verwendeten cDNA-Bibliotheken

Es wurden folgende cDNA-Bibliotheken benutzt:

1. cDNA aus bis zu 1 Stunde alten Embryonen,
kloniert in λ 641 (Rosenberg et al., 1986),
weitere Bezeichnung im Text: A
2. cDNA aus bis zu 4 Stunden alten Embryonen,
kloniert in NM1149 (Seidel, Bochum),
weitere Bezeichnung im Text: B
3. cDNA aus 4 bis 20 Stunden alten Embryonen,
kloniert in λ gt10 (Artavanis-Tsakonas et al., 1984),
weitere Bezeichnung in Text: C
4. cDNA aus einer Mischpopulation von Larven des 1. und 2.
Häutungsstadiums,
kloniert in λ gt10 (Poole et al., 1985),
weitere Bezeichnung im Text: D
5. cDNA aus Larven des 3. Häutungsstadiums (Mischpopulation
aus "kletternden" Larven),
kloniert in λ gt10 (Artavanis-Tsakonas et al., 1984),
weitere Bezeichnung im Text: E

Bei Herstellung aller verwendeten cDNA-Bibliotheken wurde die RNA mit Oligo(dT)₁₂₋₁₈ als Primer abgeschrieben und mittels "Eco RI-Linker" in die λ -Vektoren kloniert.

Die Phagen λ gt10 (Huynh et al., 1984) und NM1149 (Murray, 1983) wurden in dem E. coli-Stamm Y1073 (hsdR⁻, hsdM⁺, supE, thr, leu, thi, lacY1, tonA21, hflA150 [chr::Tn10]) (Young und Davis, 1983) und der Phage λ 641 (Murray, 1983) in dem E. coli-Stamm Q358 (hsdR⁻, hsdM⁺, supF, Φ 80^r) (Karn et al., 1980) vermehrt.

2.8.2. Ausplattieren der cDNA-Bibliotheken und Herstellung von Filterabzügen

Die λ -Phagen der cDNA-Bibliotheken wurden mit dem entsprechenden Bakterienstamm (s. 2.8.2.) auf große LB-Platten mit

10 mM MgCl₂ (s. 2.2.1.) (Ø 145 mm) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Pro Platte wurden dabei 20.000 bis 30.000 Phagen eingesetzt (Maniatis et al., 1982). Der Transfer der Phagen von der Agaroberfläche auf die Nylonmembran (s. 2.5.) erfolgte, wie bei Benton und Davis angegeben (Benton und Davis, 1977). Die Filter wurden mit Denaturierungs- und Neutralisierungslösung (s.2.5.1.) behandelt, an der Luft getrocknet und 1 Stunde bei 80°C im Vakuum gebacken.

2.8.3. Plaquehybridisierung und Vereinzelung positiver Klone

Hybridisierung an die membrangebundene DNA der λ -Phagen, Zuordnung der Signale und Vereinzelung positiver Klone wurden, im wesentlichen wie bei Bender et al. dargestellt, durchgeführt (Bender et al., 1983).

Die Filter wurden mindestens 2 Stunden in Southern-Hybridisierungslösung (s. 2.7.1.) vorinkubiert. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierter Probe (1 bis 5×10^6 cpm/ml, s. 2.6.1.) fand in einer abgedeckten Kristallisierschale 10 bis 16 Stunden bei 65°C statt. Das Waschen der Filter und die Autoradiografie wurden wie in 2.7.1. durchgeführt. Die den Signalen auf den Röntgenfilmen entsprechenden Plaques wurden mit einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen und in 1 ml SM (s. 2.2.3.) eluiert. Nach einer 1:1000-Verdünnung des Eluates wurden 10 bis 40 μ l davon mit den entsprechenden Bakterien auf kleinen Petrischalen (Ø 94 mm) ausplattiert und Filterabzüge hergestellt. Nach Hybridisierung dieser Filter und erfolgter Autoradiografie wurden die Plaques der positiven Klone ausgestochen und die DNA aus 5 ml-Lysaten (s.2.3.3.) isoliert.

2.9. DNA-Sequenzierung

Bei Sequenzierungsreaktionen wurden als radioaktiv markiertes Nukleotid $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (29,6 TBq/mmol) oder $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP (18,5 TBq/mmol) eingesetzt. Der Vorteil einer Sequenzierung mit ^{35}S -markierten Nukleotiden besteht in der größeren Banden-

schärfe und damit in einer besseren Auflösung der Bandenstruktur im oberen Bereich des Gels. Nachteilig ist, daß eine längere Expositionszeit des Films erforderlich wird (s. 2.9.3.). Mit $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP sequenzierte Proben können mehrere Tage bei -20°C aufbewahrt werden. Proben mit ^{32}P sollten dagegen am selben Tag zur Gelelektrophorese eingesetzt werden.

2.9.1. Sequenzierung von einzelsträngiger M13-DNA

Die Sequenzierung der Einzelstrang-DNA von M13-Klonen fand nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. statt (Sanger et al., 1977).

5 μl DNA aus einer 2 ml-Kultur (s. 2.2.2.2.) wurden mit 1 μl Sequenzierungsprimer (17 Bp, 0.03 Azso/ml), 1 μl TM und 3 μl H_2O eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und Zugabe von 1 μl $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP bzw. 2 μl $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP und 1 bis 3 Einheiten Klenow-Enzym wurden je 2,5 μl dieses Ansatzes für die vier basenspezifischen Reaktionen aliquotiert und mit 2 μl der entsprechenden dNTP/ddNTP-Lösung 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei Verwendung von $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP wurde die Reaktionszeit um 5 Minuten verlängert. Nach Zugabe von je 2 μl dNTP-Lösung und einer weiteren Inkubation von 15 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 μl Probenpuffer beendet. Unmittelbar vor der Gelelektrophorese fand eine fünfminütige Denaturierung der Proben bei 95°C statt.

Die Zusammensetzungen der Sequenzierungslösungen und der übrigen Puffer entsprachen im wesentlichen den bei Sanger et al. angegebenen.

Alle nukleotid-haltigen Lösungen wurden in 10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 0,1 mM EDTA angesetzt.

TM:

dNTP-Lösung:

100 mM Tris-HCl, pH 7,9
50 mM MgCl_2

je 0,25 mM aller vier dNTPs

Probenpuffer:

90 % Formamid (deionisiert, umkristallisiert)
 10 mM EDTA
 0,15 % Bromphenolblau
 0,15 % Xylencyanol

dNTP/ddNTP-Lösungen (Angaben in μ l):

	A	G	C	T
0,5 mM dATP	1	1	1	1
0,5 mM dGTP	250	12,5	250	250
0,5 mM dCTP	250	250	12,5	250
0,5 mM dTTP	250	250	250	15,5
10 mM ddATP	4			
10 mM ddGTP		8		
10 mM ddCTP			4	
10 mM ddTTP				25
TE (s. o.)	250	500	500	500

2.9.2. Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

Bei der Doppelstrang-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode wurde die klonierte DNA in präparativem Maßstab isoliert (s.2.2.1.2.). Zur Denaturierung wurden 2 μ g DNA mit 4 μ l 1 M NaOH, 0,1 mM EDTA in einem Volumen von 20 μ l 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit 2 μ l 2 M Ammoniumacetat, pH 5,4, neutralisiert und mindestens 30 Minuten mit Ethanol bei -70°C gefällt. Die DNA wurde pelletiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 8,5 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 0,1 mM EDTA aufgenommen (Chen und Seeburg, 1985). Unmittelbar danach erfolgte die Hybridisierung des entsprechenden Primers an die DNA. DNA-Lösung, 2 μ l Primer (2,5 ng/ μ l), 1,5 μ l Puffer A und 0,37 MBq $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP bzw.

0,74 MBq $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP wurden 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 Einheiten Klenow-Enzym wurde die weitere Sequenzierungsreaktion wie in 2.9.1. durchgeführt.

Für Bluescript-Klone wurden der SK- bzw. KS-Primer (Stratagene, San Diego) und für pAT153-Klone der pBR322-Eco RI- bzw. -Hind III-Primer (Pharmacia, Freiburg) eingesetzt.

Puffer A:

833 mM Tris-HCl, pH 7,5
83 mM MgCl₂
83 mM DTT
16,7 mM EDTA

2.9.3. Gelelektrophoretische Auftrennung der Sequenzierungsproben und Autoradiografie

Die Sequenzierungsproben wurden auf denaturierenden 4 bis 6 %igen Polyacrylamid-Gelen mit 8 M Harnstoff in TEB-Puffer (s. 2.3.1.) aufgetrennt. Das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid betrug 20:1.

Die besten Ergebnisse wurden mit 55 cm langen Gelen erzielt, die im oberen Bereich (ca. 35 cm) eine Dicke von 0,2 mm und im unteren (ca. 20 cm) eine von 0,4 mm hatten. Vorbehandlung der Glasplatten, Gießen der Gele und Durchführung der Gelelektrophorese mit der Macrophor-Elektrophoreseapparatur (LKB, Gräfelfing) sind bei Garoff und Ansorge ausführlich beschrieben (Garoff und Ansorge, 1981).

Die Autoradiografie der getrockneten Sequenzierungsgele erfolgte bei Raumtemperatur ohne Verstärkerfolie bei $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP 12 bis 16 Stunden, bei $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP 1,5 bis 2,5 Tage.

2.9.4. Auswertung der DNA-Sequenzdaten

DNA-Sequenzen wurden mit dem Microgenie Sequenz-Analyse-Programm, Version 4.0, von Beckmann (München) ausgewertet (Queen und Korn, 1984).

Sequenzvergleiche erfolgten mit den dem Programm beigelegten Datenbanken (Stand: September 1987), und zwar

Genetic Sequence Data Bank (GenBank), NIH;

National Biomedical Research Foundation (NBRF) Protein Data Bank.

2.10. Fliegenzucht

Fliegen des Wildtypstamms Oregon R, deren Nachkommen für die Isolierung von Speicheldrüsen und Fettkörpergewebe vorgesehen waren, wurden in Zuchtröhrchen gehalten, wie bei Lüdecke beschrieben (Lüdecke, 1985). Ansonsten wurden Embryonen aus einer Massenzucht verwendet (vgl. Koerwer, 1983).

Bei einigen Experimenten wurden Larven der Mutantenstämme 1(3)ecdysone-1^{ts} st ca (Garen et al., 1977) und 2B5,y,l(1)t435/FM6(1)/Dpy² sc⁺ Y 67g (Belyaeva et al., 1981) verwendet und, wie in den Literaturstellen angegeben, in kleinen Zuchtröhrchen gehalten.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der in Speicheldrüsen und Fettkörpern des 3. Häutungsstadiums synthetisierten Transkripte der proximalen DNA aus dem Puff 74EF

3.1.1. Zur Analyse eingesetzte DNA

Die bezüglich der Transkription charakterisierte DNA entstammt dem Locus 74EF, einem frühen ecdysteroid-induzierten Puff in den polytären Speicheldrüsen- und Fettkörperchromosomen von Larven des dritten Häutungsstadiums (Ashburner, 1973). Die bisher klonierte genomische DNA umfaßt ca. 135 kBp. Sie repräsentiert den Puff 74EF nahezu vollständig (Lücke, 1985). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die proximal gelegene DNA (74F) untersucht. Sie liegt in Form von λ -Klonen mit der Bezeichnung λ MOT 4, 6, 11 und 13 vor und erstreckt sich über ca. 57 kBp (s. 2.1.) (Möritz, 1985; Rentrop, 1984). Im folgenden werden diese DNA als 74F-DNA und die in ihr codierten Transkripte als 74F-Transkripte bezeichnet. Bei Angaben zu bestimmten DNA-Abschnitten wird die Bezeichnung des λ -Phagen mit der entsprechenden insertierten DNA benutzt oder es wird auf Subklone verwiesen. Abb. 1 zeigt eine Restriktionskarte der gesamten Region, aus der Lage und Nomenklatur der λ -Phagen mit der insertierten genomischen DNA zu ersehen sind. Die Orientierung bei allen weiteren Abbildungen von Restriktionskarten entspricht der in Abb. 1 gewählten Darstellung.

3.1.2. Isolierung von RNA

Zur Transkriptanalyse wurde Gesamt-RNA aus Speicheldrüsen und Fettkörpergewebe von Larven des dritten Häutungsstadiums eingesetzt. Die Gewebe wurden aus PS1-Larven isoliert und 1 bis 10 Stunden mit β -Ecdyson (5×10^{-6} M) inkubiert, um die in vivo nach Anstieg des Ecdysteroidtiters ablaufenden Vorgänge in vitro unter definierten, reproduzierbaren Bedingungen nachvollziehen zu können. Als Kontrollprobe diente

RNA aus Speicheldrüsen und Fettkörpern von PS1-Larven bzw. RNA aus Speicheldrüsen, die 1 oder 4 Stunden ohne zugesetztes Hormon unter sonst identischen Bedingungen inkubiert worden waren. Bei einigen sechsstündigen Inkubationen mit β -Ecdyson wurde auch Cycloheximid (7×10^{-4} M) als Inhibitor der Proteinbiosynthese zugesetzt (s. 2.4.2.).

Das Vorkommen von Transkripten aus 74F in den verschiedenen Entwicklungsstadien wurde mit Gesamt-RNA aus Embryonen unterschiedlichen Alters, Larven des 1. und 2. Häutungsstadiums, "Intermolt"-Larven, Larven des frühen und späten 3. Häutungsstadiums, "frühen" und "späten" Puppen sowie Adulten untersucht (s. 2.4.1.). Diese RNA wurde freundlicherweise von H.-J. Lücke zur Verfügung gestellt.

Die isolierte RNA wurde zunächst auf Agarosegelen mit CH_3HgOH auf Intaktheit und Kontamination mit DNA überprüft (s. 2.4.4.1.). Abb. 2 zeigt beispielhaft ein solches Gel mit Gesamt-RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern.

Eine genauere Aussage über die RNA-Qualität wurde durch Hybridisierung radioaktiv markierter Tubulin-DNA an die auf Nylonmembran transferierte RNA ermöglicht. Als Probe wurde pTu56 eingesetzt, ein Klon mit dem Gen für $\beta 2$ -Tubulin von D. melanogaster. Dieses Gen wird in allen Entwicklungsstadien und Geweben, wenn auch in unterschiedlichem Maße, exprimiert (Bialojan et al., 1984). Jede auf Nylonmembran überführte RNA wurde entweder vor oder nach der Hybridisierung mit DNA aus 74F mit pTu56 hybridisiert, weil damit neben der Intaktheit auch die Menge an transferierter RNA überprüft und verglichen werden konnte. Dabei wurde festgestellt, daß die Hybridisierung von pTu56 an Fettkörper-RNA im allgemeinen schwächer als die Speicheldrüsen-RNA war. Tubulin wird also in diesem Gewebe weniger häufig synthetisiert als in Speicheldrüsen (s. z.B. Abb. 6B). Die Autoradiogramme der Tubulin-Hybridisierungen (1,8 kB mRNA) sind jeweils unter denen der Hybridisierungen mit 74F-DNA abgebildet (2 bis 6 Stunden Vor-

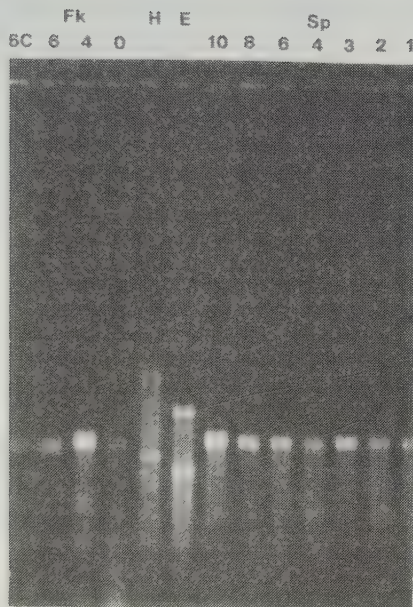


Abb. 2: 0,9 %iges Hg-Agarosegel mit Gesamt-RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern

Pro Gelbahn wurden 1,5 bis 2 μ g Gesamt-RNA aufgetragen.

- Sp : Speicheldrüsen
 Fk : Fettkörper
 0...10: Stunden Inkubation mit β -Ecdyson (5×10^{-6} M) bei 25°C
 6C : 6 Stunden Inkubation mit β -Ecdyson (5×10^{-6} M) und Cycloheximid (7×10^{-4} M) bei 25°C
 H : poly(A⁻)-RNA aus HeLa-Zellen (28 S und 18 S)
 E : ribosomale RNA aus E. coli (23 S und 16 S)

hybridisierung bei 42°C; 24 Stunden Hybridisierung bei 42°C mit "nick-translatierter" pTu56-DNA; spez. Akt.: 0,8 bis 2 $\times 10^8$ cpm/ μ g; 3 $\times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung; Belichtungszeit: 24 Stunden).

Die isolierte Gewebe-RNA wurde weiteren Qualitätskontrollen unterzogen.

In Abb. 3A ist die Hybridisierung von λ LEMBL3 an RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern gezeigt. In diesem λ -Klon ist unter anderem das Gen für das speicheldrüsen-spezifische Sekretionsprotein 4 (Sgs 4) enthalten, das im Locus 3C codiert ist (Koerwer, 1983). 3C bildet einen Zwischenhäutungspuff in PS 1, der bei Anstieg des Ecdysteroid-Titers am Ende des 3. Häutungsstadiums eine Regression durchmacht. Das Hybridisierungssignal ist bei der Kontroll-RNA aus PS1-Speicheldrüsen ("0 Stunden") erwartungsgemäß stärker als bei RNA aus hormoninkubierten Speicheldrüsen. Bei Fettkörper-RNA tritt kein Signal auf.

Durch Hybridisierung mit cDm61 wurde die Kontamination von Speicheldrüsen-RNA mit Fettkörper-RNA überprüft. cDm61 ist ein cDNA-Klon des Gens für eine Untereinheit des larvalen Serumproteins 1 (LSP1 λ , Locus 61A) (Koerwer, 1983; Hirschberg, 1984). Dieses Gen wird ausschließlich im Fettkörper von Larven des 3. Häutungsstadiums unter Einfluß von Ecdysteroiden exprimiert. Innerhalb einer Stunde nach der Häutung bis kurz vor der Verpuppung ist die RNA nachweisbar (Lepesant et al., 1982). Abb. 3B zeigt die Hybridisierung von cDm61 an RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern. Neben dem Hybridisierungssignal der RNA von LSP1 λ (2,5 kB, L) tritt in Fettkörper-RNA ein weiteres, bisher nicht charakterisiertes Signal (X) auf, das einer Transkriptlänge von ca. 0,9 kB entspricht. Dieses Transkript ist auch in Speicheldrüsen-RNA in geringem Maße vorhanden, während die LSP1 λ -RNA in der Speicheldrüsen-RNA nicht nachgewiesen werden kann. Daraus folgt, daß die Kontamination der zur RNA-Präparation verwendeten Speicheldrüsen mit Fettkörpergewebe vernachlässigbar gering ist.

RNA aus inkubierten Speicheldrüsen wurde mit 56H8-DNA hybridisiert, einem Klon, der das Gen (hsp 70, Locus 87A bzw. 87C) für das 70 kD-Hitzeschockprotein von D. melanogaster enthält (Artavanis-Tsakonas et al., 1979). Mit diesem Experiment sollte überprüft werden, inwieweit die in vitro-Inkuba-

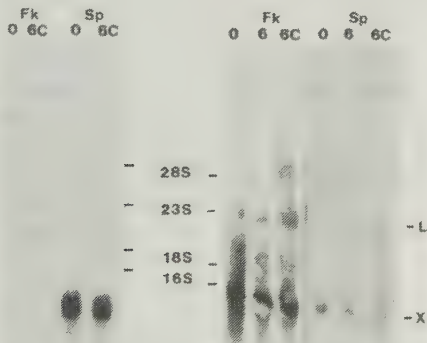
Abb. 3: Autoradiogramm der Hybridisierungen von λ EMBL3 und cDm61 an immobilisierte RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern

Auf einem 0,9 %igen FA-Agarosegel wurden pro Gelbahn 10 μ g Gesamt-RNA aus den angegebenen Geweben aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und 6 Stunden bei 42°C vorhybridisiert. Nach den Hybridisierungen erfolgten Waschen der Membran und Autoradiografie, wie in 2.7.1. beschrieben.

Sp : Speicheldrüsen
Fk : Fettkörper
0, 6...: Stunden Inkubation mit β -Ecdyson (5×10^{-6} M) bei 25°C
6C : 6 Stunden Inkubation mit β -Ecdyson (5×10^{-6} M) und Cycloheximid (7×10^{-4} M) bei 25°C

A: Hybridisierung mit "nick-translatierter" λ EMBL3-DNA: 65 Stunden bei 42°C; spez. Akt.: $1,9 \times 10^8$ cpm/ μ g; $3,4 \times 10^8$ cpm/ml Hybridisierungslösung
Belichtungszeit: 70 Stunden

B: Hybridisierung mit "nick-translatierter" cDm61-DNA: 48 Stunden bei 42°C; spez. Akt.: $1,5 \times 10^8$ cpm/ μ g; $3,3 \times 10^8$ cpm/ml Hybridisierungslösung; Belichtungszeit: 21 Stunden (Fk) bzw. 48 Stunden (Sp)



A

B

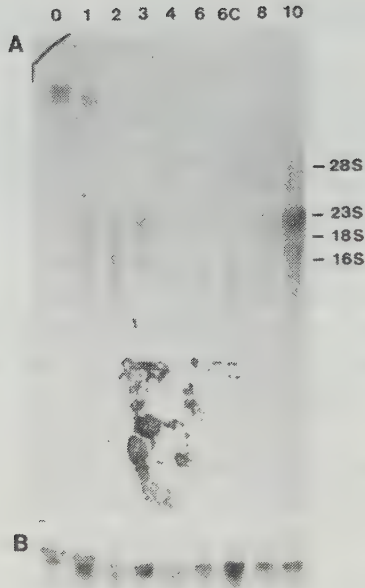


Abb. 4: Autoradiogramm der Hybridisierung von 56H8 an immobilisierte RNA aus inkubierten Speicheldrüsen

s. Legende zu Abb. 3

A: Vorhybridisierung: 22 Stunden bei 42°C; Hybridisierung mit "nick-translatierter" 56H8-DNA: 24 Stunden bei 42°C; spez. Akt.: $1,6 \times 10^8$ cpm/ μ g; $2,7 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung; Belichtungszeit: 24 Stunden

B: Hybridisierung von pTu56-DNA an diese RNA

tion von Larvengewebe artefizielle Veränderungen des Gewebes und damit auch der mRNA-Population hervorruft. Hitzeschockproteine werden nicht nur bei erhöhter Temperatur, sondern auch bei Einwirkung anderer externer Streß-Faktoren, z.B.

Ethanol, Wasserstoffperoxid, Schwermetallionen und Entkoppeln der oxidativen Phosphorylierung, in zunehmendem Maße synthetisiert (Ashburner und Bonner, 1979). Abb. 4 ist zu entnehmen, daß geringe Mengen hsp 70-mRNA (2,4 kB) wohl in inkubierten Speicheldrüsen, nicht aber in sofort nach dem Sezieren eingefrorenen Speicheldrüsen vorhanden sind. Nach zehnstündiger Inkubation nimmt die Menge der hsp 70-mRNA sprunghaft zu. Daraus folgt, daß bei derart langen Inkubationen die in vivo in diesem Gewebe ablaufenden Vorgänge in vitro nicht mehr nachvollzogen werden können. Deshalb wurde bei den weiteren Experimenten auf die Interpretation von Daten solch langzeitiger Inkubationen verzichtet.

3.1.3. Transkriptanalyse mit λ MOT 6-DNA

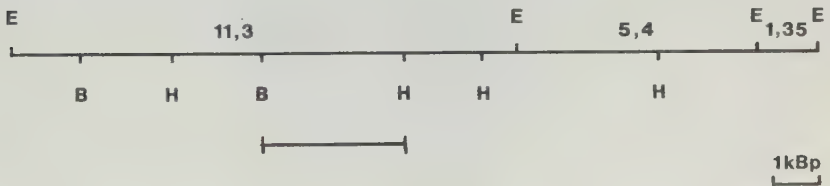


Abb. 5: Übersichtsrestriktionskarte von λ MOT 6

Restriktionsenzyme: E = Eco RI
H = Hind III
B = Bam HI

(-) mit cDNA aus Embryonen und Adulten hybridisierendes Restriktionsfragment

Die transkribierte Region der insertierten DNA dieses λ -Phagen wurde von Rentrop durch Hybridisierung radioaktiv markierter cDNA aus Embryonen und Adulten an restringierte und immobilisierte DNA von λ MOT 6 eingegrenzt (Rentrop; 1984). Abb. 5 zeigt eine Übersichtsrestriktionskarte der DNA. Das mit cDNA hybridisierende Bam HI-Hind III-Fragment ist in die-

ser Abbildung gekennzeichnet.

Zur Transkriptanalyse wurde durch "Nick-Translation" radioaktiv markierte λ MOT 6-DNA eingesetzt. Aufgrund des ungünstigen Vektor-Insert-Verhältnisses bei λ -Klonen, der unbekannten Größe des codierenden Bereichs innerhalb der insertierten

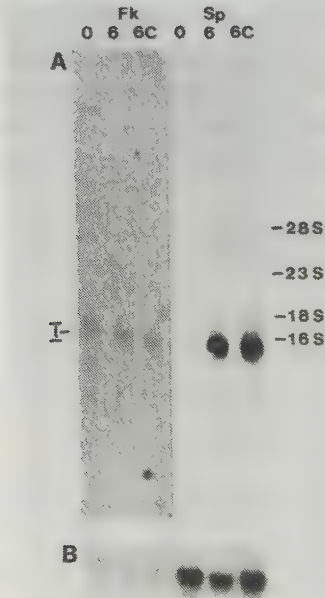


Abb. 6: Autoradiogramm der Hybridisierung von λ MOT 6 an immobilisierte RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern

s. Legende zu Abb. 3

- A: Hybridisierung mit "nick-translatierter λ MOT 6-DNA: 65 Stunden bei 42°C; spez. Akt.: $1,6 \times 10^8$ cpm/ μ g; 4×10^7 cpm/ml Hybridisierungslösung; Belichtungszeit: 4 Tage (Sp) bzw. 7 Tage (Fk)
- B: Hybridisierung von pTu56-DNA an diese RNA. Die pTu56-Hybridisierung wurde nach der Hybridisierung mit λ MOT 6 durchgeführt.

DNA und der voraussichtlich geringen Häufigkeit der homologen mRNA in Gesamt-RNA aus Larvengewebe wurden zur radioaktiven Markierung 400 ng DNA und je 1,85 MBq $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP und $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP eingesetzt, um eine möglichst hohe spezifische Aktivität und eine ausreichende Menge markierter spezifischer DNA zu erhalten.

DNA aus λ MOT 6 codiert für ein ca. 1,5 kB großes Transkript, das in 6 Stunden mit β -Ecdyson bzw. mit β -Ecdyson und Cycloheximid inkubierten Speicheldrüsen sehr viel häufiger ist als in solchen aus PS1-Larven ("0 Stunden") (Abb. 6). Dieses Transkript - im folgenden als I bezeichnet - ist in Fettkörper-RNA unabhängig von der Behandlung des Gewebes nur in geringer Konzentration vertreten.

Zur genaueren Charakterisierung des Transkripts I wurde das 3,0 kBp große Bam HI-Hind III-Fragment aus λ MOT 6 (s. Abb. 5) in den Vektor pSPT19 subkloniert (Bezeichnung des Subklons: Pe2). Die DNA von Pe2 wurde mit Hind III bzw. Bam HI linearisiert und mit SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase zur in vitro-Transkription verwendet (2.6.1.). Die so erhaltene, radioaktiv markierte RNA wurde zur Hybridisierung an immobilisierte RNA aus Speicheldrüsen, die 0 bis 10 Stunden mit β -Ecdyson bzw. β -Ecdyson und Cycloheximid inkubiert worden waren, eingesetzt (s. 2.5.2.).

Aus Abb. 7 sind folgende Ergebnisse abzuleiten:

- a) Das durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA aus Embryonen und Adulten eingegrenzte Hind III-Bam HI-Fragment (s. Abb.5) enthält für Transkript I codierende DNA.
- b) Durch Einsatz der in vitro-transkribierten RNA, die von jeweils einem Strang der DNA abgeschrieben wurde, konnte die Transkriptionsrichtung von I bestimmt werden (vgl. Abb. 7A und 7B): Das 5'-Ende von Transkript I liegt proximal zum Centromer.
- c) Die Zunahme der Transkriptmenge bei Inkubationen von Speicheldrüsen mit β -Ecdyson erreicht ein Maximum bei 4 Stunden und nimmt danach wieder ab (s. Abb. 7C). Die Zunahme beträgt - relativ zur mRNA-Menge von Tubulin - ungefähr das Fünffache. Der erneute Anstieg bei 8 bzw. 10 Stunden

- wurde aufgrund der in 3.1.2. dargestellten Ergebnisse der Hybridisierung mit 56H8-DNA nicht weiter berücksichtigt.
- d) Die Inhibierung der Proteinbiosynthese führt zu einer Stabilisierung der mRNA von I. Bei sechsständiger Hormon-Inkubation in Gegenwart von Cycloheximid ist die Transkriptmenge ungefähr sechsmal so groß wie die in Abwesenheit von Cycloheximid unter sonst identischen Bedingungen nachweisbare Transkriptmenge.
- e) Die starke Zunahme der Transkriptmenge bei sechsständiger Hormoninkubation, die in Abb. 6 gezeigt wurde, konnte in diesem und in weiteren Experimenten (Daten nicht gezeigt) nicht reproduziert werden.

Legende zu Abb. 7: Autoradiogramme der Hybridisierungen in vitro-transkribierter RNA von Pe2-Bam HI und Pe2-Hind III an immobilisierte RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung

s. Legende zu Abb.3

A: Hybridisierung in vitro-transkribierter RNA von Pe2-Bam HI

B: Hybridisierung in vitro-transkribierter RNA von Pe2-Hind III

Vorhybridisierung: 16 Stunden bei 58°C;

Hybridisierung: 24 Stunden bei 58°C;

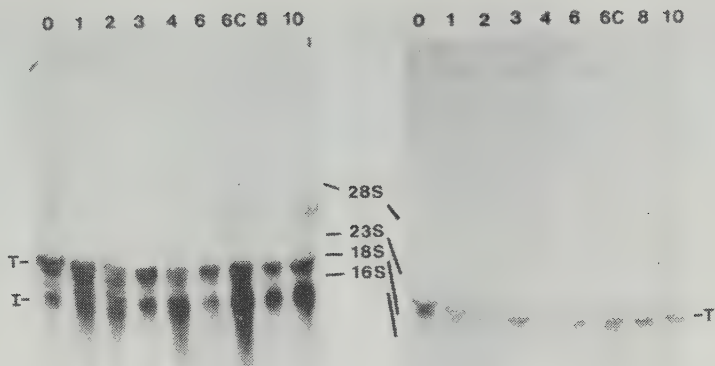
3,5 x 10⁶ cpm/ml Hybridisierungslösung;

Belichtungszeit: 2 Tage

Zum direkten Mengenvergleich der immobilisierten RNA wurden die Signale der vorgehenden Hybridisierung mit pTu56-DNA nicht abgewaschen.

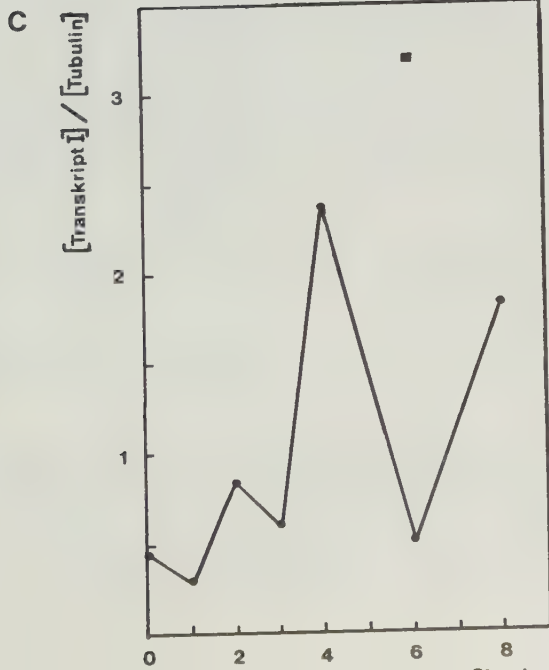
C: Densitometrische Auswertung von A mit kürzerer Expositionszeit (1 Tag)

Die Filmschwärzung des Autoradiogramms wurde an jeweils drei Positionen pro Gelbahn gemessen, gemittelt und in Beziehung zu der Filmschwärzung der entsprechenden Tubulin-Hybridisierungssignale (T) gesetzt. Kreise bezeichnen die Inkubationen mit β -Ecdyson und das Quadrat die Inkubation mit β -Ecdyson und Cycloheximid. Der Wert für die zehnstündige Inkubation wurde nicht aufgeführt.



A

B



Hybridisierung von Pe2 an RNA aus Speicheldrüsen, die 1 bzw. 4 Stunden mit β -Ecdyson oder unter identischen Bedingungen ohne Hormon inkubiert worden waren (s. 2.4.2.1.), sollte klären, ob der Anstieg der Transkriptmenge von I auf den Einfluß des Steroidhormons zurückzuführen ist. In Abb. 8 ist zu

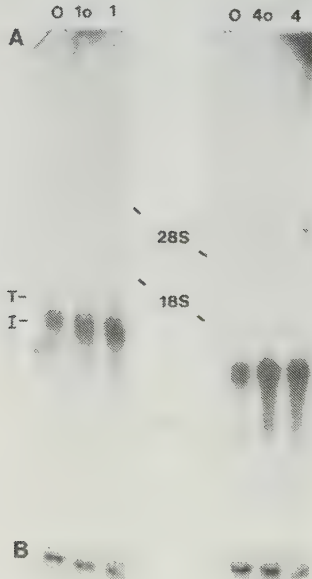


Abb. 8: Autoradiogramme der Hybridisierungen von Pe2 an immobilisierte RNA aus mit bzw. ohne Hormon inkubierten Speicheldrüsen

s. Legende zu Abb. 3

1o, 4o: Stunden Inkubation ohne zugesetztes Hormon bei 25°C

Vorhybridisierung: 36 Stunden bei 58°C

A: Hybridisierung in vitro-transkribierter RNA von Pe2-Bam HI: 48 Stunden bei 58°C; $4,2 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung; Belichtungszeit: 4 Tage

B: Hybridisierung von pTu56-DNA an diese RNA (T)

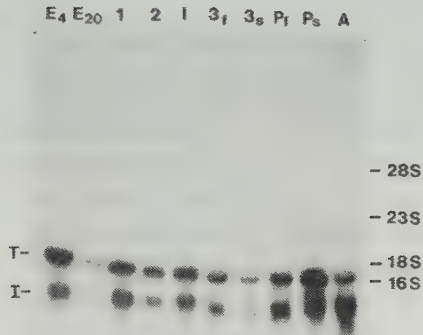


Abb.9: Autoradiogramm der Hybridisierung von Pe2 an immobilisierte RNA der verschiedenen Entwicklungsstadien

Auf einem 0,9 %igen FA-Agarosegel wurden je 10 µg Gesamt-RNA aus den angegebenen Stadien (s. 2.4.1.) aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und 20 Stunden bei 58°C vorhybridisiert. Nach der angegebenen Hybridisierung erfolgten das Waschen der Membran und die Autoradiografie, wie in 2.7.2. angegeben.

- E4, E20: RNA aus höchstens 4 bzw. 20 Stunden alten Embryonen
- 1, 2 : RNA aus Larven des 1. bzw. 2. Häutungsstadiums
- I : "Intermolt"-Larven
- 3f, 3s : RNA aus Larven des frühen bzw. späten 3. Häutungsstadiums
- Pf, Ps : RNA aus "frühen" bzw. "späten" Puppen
- A : RNA aus Adulten

Hybridisierung mit in vitro-transkribierter RNA von Pe2-Bam HI: 24 Stunden bei 58°C; $1,8 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung; Belichtungszeit: 2 Tage
Zum direkten Mengenvergleich der immobilisierten RNA wurden die Signale der vorhergehenden Hybridisierung mit pTu56-DNA nicht abgewaschen (T).

sehen, daß die beobachtete Zunahme auch ohne β -Ecdyson stattfindet. Daraus folgt, daß die Regulation der Expression von I hormonunabhängig ist.

Abb. 9 zeigt das Auftreten von Transkript I in den verschiedenen Entwicklungsstadien von D. melanogaster. Relativ zur Tubulin-RNA ist es in fast allen Stadien ungefähr gleich häufig vertreten. Festzustellen sind lediglich eine Verringerung der Transkriptmenge in Larven des späten 3. Häutungsstadiums bzw. eine Zunahme in adulten Fliegen.

Transkript I konnte auch in Speicheldrüsen-RNA von *ecd¹*-Larven, die bei 29°C gehalten worden waren, nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Damit wurde die Hormon-Unabhängigkeit der Expression von I bestätigt. Die temperatur-sensitive Mutante (*l(3)ecdysone-l^{ts}*) zeichnet sich durch eine Ecdysteroiddefizienz bei nicht-permissiver Temperatur aus. Der Ecdysteroidtiter beträgt bei Larven des 3. Häutungsstadiums, die erhöhter Temperatur ausgesetzt waren, lediglich 5 % des Wildtyp-Wertes (Garen et al., 1977).

Auch in RNA aus inkubiertem bzw. nicht inkubiertem Gewebe von Larven des Stamms *l(1)t435*, der eine Mutation im Locus 2B5, einem frühen ecdysteroidinduzierten Puff, trägt, ist Transkript I vorhanden (Daten nicht gezeigt). In vivo tritt in diesen Mutanten kein früher ecdysteroidinduzierter Puff auf. Bei in vitro-Inkubationen von Speicheldrüsen mit β -Ecdyson erreicht der Puff 74EF nur 30 bis 40 % seiner normalen Größe in Wildtyp-Larven (Belyaeva et al., 1981).

Die immobilisierte Mutanten-RNA für diese Experimente wurde dankenswerterweise von G. Feigl zur Verfügung gestellt.

I konnte auch in weiteren Fliegenstämmen mit anderen Mutationen des Locus 2B5 nachgewiesen werden (J. Galceran, persönliche Mitteilung).

3.1.4. Transkriptanalyse mit λ MOT 4-DNA

In λ MOT 4 codierte Transkripte wurden bereits weitgehend charakterisiert (Möritz, 1985; Feigl, 1986). Bei den bislang durchgeführten Experimenten wurden DNA des 0,8 kbp- und des 4,8 kbp-Eco RI-Eco RI-Fragments (s. Abb. 10) bzw. dazugehö-

rige cDNA-Klone verwendet. Neben diesen beiden Fragmenten hybridisiert auch das benachbarte 2,4 kbp-Eco RI-Eco RI-Fragment mit radioaktiv markierter cDNA aus Embryonen und Adulten (Rentrop, 1984). Abb. 10 stellt die Übersichtsrestriktionskarte der insertierten DNA dieses Phagen dar.

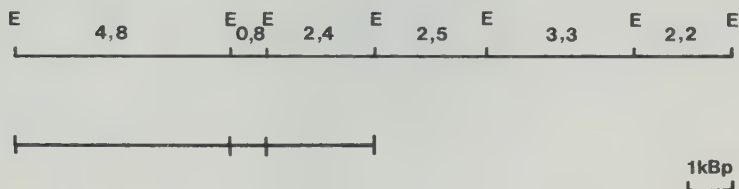


Abb. 10: Übersichtsrestriktionkarte von λ MOT 4

Restriktionsenzym: E = Eco RI

(-) mit cDNA aus Embryonen und Adulten hybridisierende Restriktionsfragmente

Da nicht auszuschließen war, daß weitere, bislang noch nicht entdeckte Transkripte in den übrigen Fragmenten des Phagen codiert sind, wurde "nick-translatierte" λ MOT 4-DNA an immobilisierte RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern hybridisiert. Abb. 11 zeigt das Ergebnis dieses Experiments. Es sind drei Hybridisierungssignale zu erkennen, die einer Transkriptlänge von ca. 5 kbp (II), 2,7 kbp (III) und 1,9 kbp (IV) entsprechen. Alle drei Transkripte sind sowohl in Speicheldrüsen als auch in Fettkörpern in geringer Konzentration vorhanden. Die Hybridisierungssignale sind sehr schwach. Am schwächsten ist das Signal von II, obwohl die anschließend durchgeführte Hybridisierung mit pTu56-DNA zeigte, daß die RNA mit üblicher Effizienz auf die Membran transferiert worden war. Wegen der geringen Signalintensität können aus diesem Experiment keine gesicherten Aussagen über Zu- oder Abnahme der jeweiligen Transkriptmenge gemacht werden. Die Transkripte II, III und IV sind jedoch bereits von Möritz beschrieben worden. Sie stammen aus dem 0,8 kbp- und

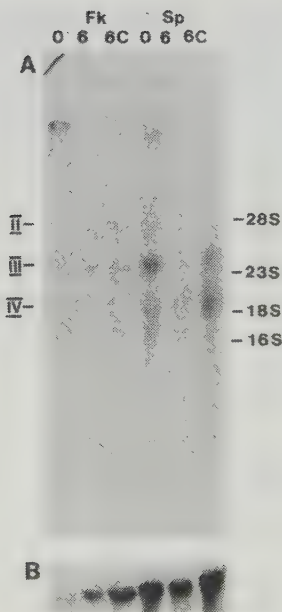


Abb. 11: Autoradiogramm der Hybridisierung von λ MOT 4 an immobilisierte RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern

s. Legende zu Abb. 3

- A: Hybridisierung mit "nick-translatierter" λ MOT 4-DNA: 65 Stunden bei 42°C; spez. Akt.: $1,3 \times 10^8$ cpm/ μ g; $2,2 \times 10^7$ cpm/ml Hybridisierungslösung; Belichtungszeit: 7 Tage
- B: Hybridisierung von pTu56-DNA an diese RNA (Belichtungszeit: 48 Stunden). Die pTu56-Hybridisierung wurde nach der Hybridisierung mit λ MOT 4-DNA durchgeführt.

dem 4,8 kBp-Eco RI-Eco RI-Fragment (Möritz, 1985). Experimente von Feigl mit einem cDNA-Klon bzw. Subklonen der genomischen DNA von λ MOT 4 haben gezeigt, daß die Transkripte III und IV hormonunabhängig in beiden Geweben synthetisiert werden (Feigl, 1986). Bemerkenswert ist, daß ein 0,9 kBp-Tran-

skript, das durch Hybridisierung eines cDNA-Klons zu dem 4,8 kBp-Eco RI-Eco RI-Fragment in Speicheldrüsen- und Fettkörper-RNA gefunden wurde (Feigl, 1986), bei dieser Hybridisierung nicht nachgewiesen werden konnte.

3.1.5. Transkriptanalyse mit λ MOT 11-DNA

In Abb. 12 ist die Übersichtsrestriktionskarte der insertierten DNA von λ MOT 11 dargestellt. Die mit cDNA aus Embryonen und Adulten hybridisierenden Restriktionsfragmente sind in der Abbildung gekennzeichnet (Rentrop, 1984).

Die Hybridisierung "nick-translatierter" λ MOT 11-DNA an immobilisierte RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern führte zum Nachweis von zwei Transkripten (s. Abb. 13).

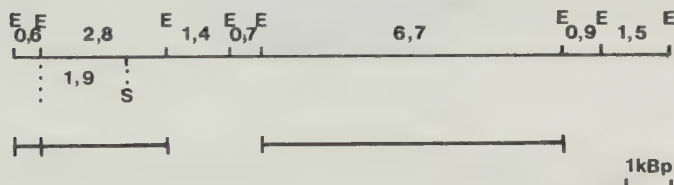


Abb. 12: Übersichtsrestriktionskarte von λ MOT 11

Restriktionsenzyme: E = Eco RI
S = Sal I

(-) mit cDNA aus Embryonen und Adulten hybridisierende Restriktionsfragmente

Das größere Transkript (V, ca. 1,7 kB) tritt ausschließlich und mit großer Häufigkeit im Fettkörper auf. Die Inkubation des Gewebes mit Hormon bewirkt keine sichtbare Veränderung der Transkriptmenge von V. Das wesentlich seltenere, kleinere Transkript (VI, ca. 0,8 bis 0,9 kB) ist in Speicheldrüsen vorhanden. Zu einer möglichen Expression im Fettkörper kann aus diesem Experiment keine Aussage gemacht werden, da gegebenenfalls das starke Hybridisierungssignal von V ein schwaches Signal von VI überdecken würde. Die Transkriptmenge von

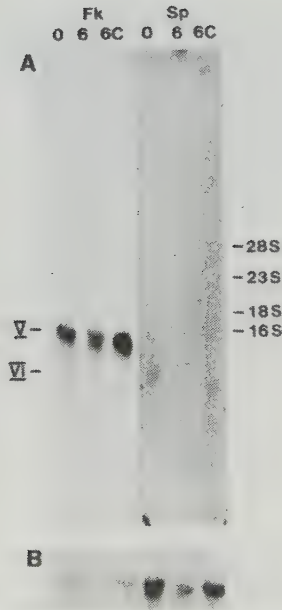


Abb. 13: Autoradiogramm der Hybridisierung von λ MOT 11 an RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern

s. Legende zu Abb. 3

A: Hybridisierung mit "nick-translatierter" λ MOT 11-DNA: 65 Stunden bei 42°C; spez. Akt.: $1,3 \times 10^8$ cpm/ μ g; $1,3 \times 10^7$ cpm/ml Hybridisierungslösung; Belichtungszeit: 4 Tage (Fk) bzw. 7 Tage (Sp)

B: Hybridisierung von pTu56-DNA an diese RNA (Belichtungszeit: 45 Stunden). Die pTu56-Hybridisierung wurde nach der Hybridisierung mit λ MOT 11-DNA durchgeführt.

VI ist in Speicheldrüsen, die sechs Stunden mit β -Ecdyson inkubiert worden waren, deutlich geringer als in PS1-Speicheldrüsen ("0 Stunden"). Dagegen ist die Häufigkeit von VI in zusätzlich mit Cycloheximid inkubierten Speicheldrüsen mit der in PS1 vergleichbar.

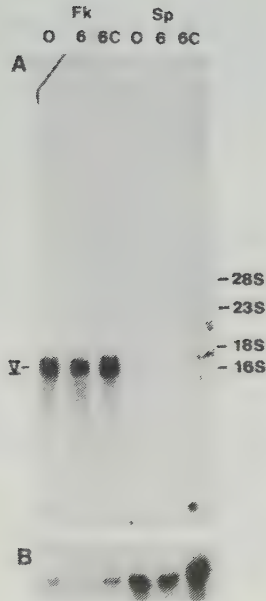


Abb. 14: Autoradiogramm der Hybridisierung des 6,7 kBp-Eco RI-Eco RI-Fragments an immobilisierte RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern

s. Legende zu Abb. 3

A: Hybridisierung mit "nick-translatiertem" 6,7 kBp-Eco RI-Eco RI-Fragment: 65 Stunden bei 42°C; spez. Aktivität: 1×10^8 cpm/ μ g; $2,9 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung; Belichtungszeit: 1,5 Tage

B: Hybridisierung von pTu56-DNA an diese RNA

In weiteren Experimenten wurde geklärt, welcher Bereich der insertierten DNA von λ MOT 11 für die Transkripte V und VI codiert. Dazu wurde das 6,7 kBp-EcoRI-Eco RI-Fragment des Phagen isoliert (s. 2.3.2.), direkt zur "Nick-Translation" eingesetzt und an immobilisierte RNA hybridisiert. Abb. 14

zeigt, daß die DNA dieses Fragments für Transkript V codiert. Hybridisierungen unter den oben angegebenen Bedingungen mit folgenden Fragmenten aus λ MOT 11 ergaben keine Signale: 0,7 kBp-Eco RI-Eco RI, 1,4 kBp-Eco RI-Eco RI, 0,9 kBp-Sal I-Eco RI. Lediglich das 1,9 kBp-Eco RI-Sal I- und das 0,6 kBp-Eco RI-Eco RI-Fragment, dessen proximale Eco RI-Schnittstelle artefiziell bei der Klonierung der genomischen DNA entstanden ist (Eco RI*), zeigen Transkript VI entsprechende Hybridisierungssignale. Die insertierte DNA der Phagen λ MOT 11 und 13 überlappt um ca. 5.5 kBp, in denen diese beiden Fragmente enthalten sind (s. Abb. 1). Die weitere Charakterisierung von VI ist in 3.1.6. beschrieben.

3.1.6. Transkriptanalyse mit λ MOT 13-DNA

Auch in der insertierten DNA von λ MOT 13 hybridisieren einige Restriktionsfragmente mit radioaktiv markierter cDNA (s. Abb. 15; Rentrop, 1984).

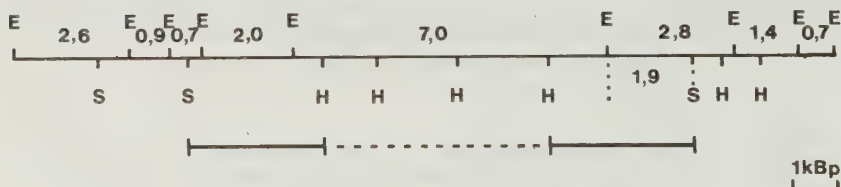


Abb. 15: Übersichtsrestriktionskarte von λ MOT 13

Restriktionsenzyme: E = Eco RI
H = Hind III
S = Sal I

(-) mit cDNA aus Embryonen und Adulten hybridisierende Restriktionsfragmente

Abb. 16 zeigt die Hybridisierung "nick-translatierter" λ MOT 13-DNA an immobilisierte RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern. Es sind drei Hybridisierungssignale zu sehen, die folgenden Transkriptlängen entsprechen: ca. 6 kB

(VII), ca. 2 kB (VIII) und ca. 0,8 bis 0,9 kB (VI). Transkript VII ist nur in Speicheldrüsen-RNA mit geringer Konzentration vertreten. Die nachweisbare Transkriptmenge ist unabhängig von der Hormon-Inkubation des Gewebes. Transkript VIII ist etwas häufiger als VII und sowohl in Spei-

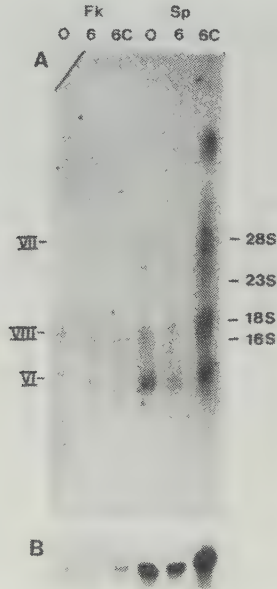


Abb. 16: Autoradiogramm der Hybridisierung von λ MOT 13-DNA an immobilisierte RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern

s. Legende zu Abb. 3

A: Hybridisierung mit "nick-translatierter" λ MOT 13-DNA: 65 Stunden bei 42°C; spez. Akt.: $1,2 \times 10^8$ cpm/ μ g; $1,2 \times 10^7$ cpm/ml Hybridisierungslösung; Belichtungszeit: 7 Tage

B: Hybridisierung von pTu56-DNA an diese RNA. Die pTu56-Hybridisierung wurde nach der Hybridisierung mit λ MOT 13 durchgeführt.

cheldrüsen als auch in Fettkörpern vertreten. Auch hier hat β -Ecdyson keinen Einfluß auf die Transkriptmenge (s. 3.2.2.). Transkript VI ist bereits unter 3.1.6. beschrieben worden (s. Abb. 13). Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, daß VI in geringer Konzentration auch in Fettkörper-

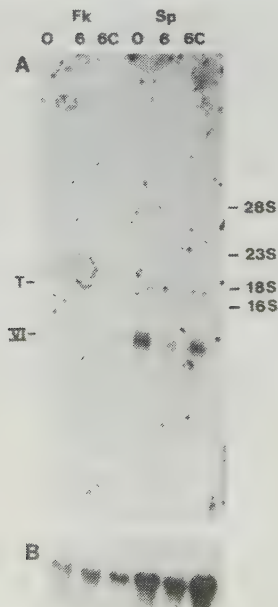


Abb. 17: Autoradiogramm der Hybridisierung von *gr* an immobilisierte RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern

s. Legende zu Abb. 3

A: Hybridisierung mit *in vitro*-transkribierter RNA von *gr*-Hind III: 48 Stunden bei 58°C; $7,5 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung; Belichtungszeit: 3 Tage

Die Signale der vorhergehenden Hybridisierung mit pTu56-DNA sind nicht vollständig abgewaschen worden (T).

B: Hybridisierung mit pTu56-DNA an diese RNA (T)

RNA vorhanden ist. Die in Speicheldrüsen-RNA beobachtete Abnahme der Transkriptmenge bei sechsstündiger Hormon-Inkubation des Gewebes findet im Fettkörper nicht statt. Für weitere Untersuchungen wurde das 1,9 kBp-Eco RI-Sal I-Fragment aus λ MOT 13 bzw. 11 in den Vektor pSPT18 subkloniert (Bezeichnung des Subklons: gr). Durch vorhergehende Experimente war bekannt, daß dieses und das benachbarte 0,6 kBp-Eco RI*-Eco RI-Fragment für Transkript VI codierende DNA enthalten (s. 3.1.5.). Die DNA von gr wurde mit Hind III bzw. Eco RI linearisiert und zur in vitro-Transkription mit T7- bzw. SP6-RNA-Polymerase eingesetzt (2.6.1.). Durch Verwendung dieser in vitro-transkribierten RNA bei Hybridisierungen konnte die Transkriptionsrichtung von VI ermittelt werden: Das 5'-Ende von VI liegt distal zum Centromer. In Abb. 17 ist die Hybridisierung in vitro-transkribierter RNA von gr-Hind III an immobilisierte RNA aus inkubierten Speichel-

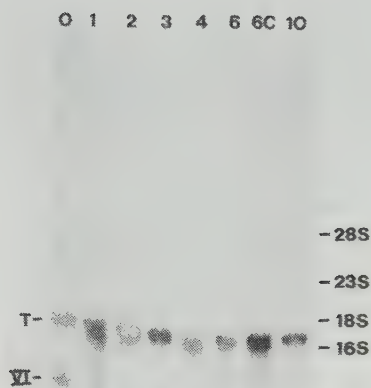
Legende zu Abb. 18: Autoradiogramm der Hybridisierung von gr an immobilisierte RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung

s. Legende zu Abb. 3

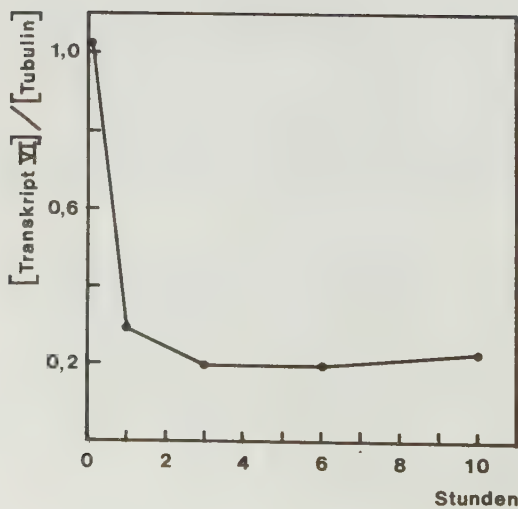
A: Hybridisierung in vitro-transkribierter RNA von gr-Hind III: 24 Stunden bei 58°C; $3,2 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung; Belichtungszeit: 2 Tage Zum direkten Mengenvergleich der immobilisierten RNA wurden die Signale der vorhergehenden Hybridisierung mit pTu56-DNA nicht abgewaschen (T).

B: Densitometrische Auswertung von A Die Filmschwärzung des Autoradiogramms von VI wurde an jeweils 3 Positionen pro Gelbahn gemessen, gemittelt und in Beziehung zur Filmschwärzung des entsprechenden Tubulin-Hybridisierungssignals gesetzt. Die Werte für die zwei- und fünfstündige Inkubation wurden wegen der geringen RNA-Qualität in diesen Gelbahnen nicht aufgeführt.

A



B



drüsen und Fettkörpern dargestellt. Bei Einsatz in vitro-transkribierter RNA des Gegenstrangs (gr-Eco RI) traten keine Hybridisierungssignale auf.

Die Transkriptmenge von VI in Speicheldrüsen nimmt bei in vitro-Inkubation des Gewebes mit β -Ecdyson schnell ab. Schon nach einer einstündigen Inkubation ist nur noch ein Drittel,

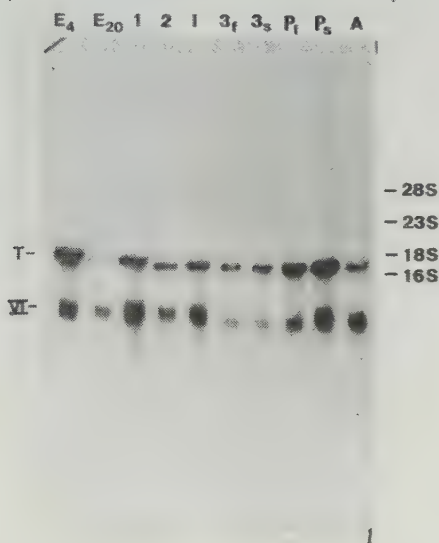


Abb. 19: Autoradiogramm der Hybridisierung von gr an immobilisierte RNA der verschiedenen Entwicklungsstadien

s. Legende zu Abb. 9

Hybridisierung in vitro-transkribierter RNA von gr-Hind III: 24 Stunden bei 58°C; 3×10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung; Belichtungszeit: 2 Tage
Zum direkten Mengenvergleich der immobilisierten RNA wurden die Signale der vorhergehenden Hybridisierung mit pTu56-DNA nicht abgewaschen (T).

nach drei Stunden nur noch ein Fünftel der in PS1-Speicheldrüsen nachweisbaren Menge vorhanden. Dieser Wert bleibt bei längeren Inkubationen annähernd konstant (s. Abb. 18). Auch in vivo kann diese Abnahme der Transkriptmenge von VI gezeigt werden. Aus Abb. 19, bei der eine Hybridisierung in

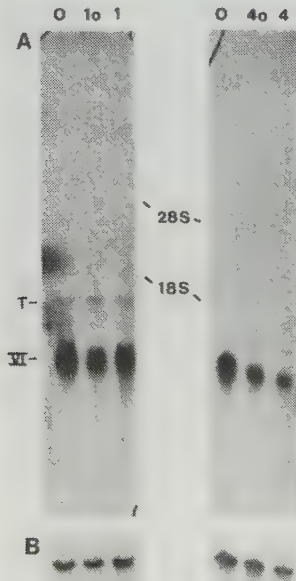


Abb. 20: Autoradiogramme der Hybridisierungen von gr an immobilisierte RNA aus mit bzw. ohne Hormon inkubierten Speicheldrüsen

s. Legende zu Abb. 3

A: Hybridisierung in vitro-transkribierter RNA von gr-Hind III: 48 Stunden bei 58°C; 4×10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung; Belichtungszeit: 4 Tage

B: Hybridisierung von pTu56-DNA an diese RNA (T)

vitro-transkribierter RNA von gr-Hind III an immobilisierte RNA verschiedener Entwicklungsstadien dargestellt ist, folgt, daß VI zwar in allen untersuchten Stadien, aber in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert wird. Relativ zur Tubulin-mRNA ist Transkript VI im 1. Häutungsstadium und in Adulten am häufigsten. Beim Übergang von "Intermolt"-Larven (PS 1) zu Larven des frühen und späten 3. Häutungsstadiums (PS 3-6, bzw. mindestens PS 8; s. 2.4.1.) nimmt die Transkriptmenge deutlich ab. Erst in "frühen" Puppen ist wieder eine höhere Konzentration festzustellen.

Es wurde außerdem nachgewiesen, daß VI in RNA aus isolierten Oozyten mit großer Häufigkeit vertreten ist (Daten nicht gezeigt).

Um festzustellen, ob die Abnahme von VI auf den Einfluß von β -Ecdyson zurückzuführen ist, wurden Speicheldrüsen 1 bzw. 4 Stunden mit Hormon bzw. unter identischen Bedingungen ohne Hormon inkubiert (s. 2.4.2.1.). Die daraus isolierte RNA wurde mit in vitro-transkribierter RNA von gr-Hind III hybridisiert. Aus Abb. 20 ist abzuleiten, daß die auch in vivo beobachtete Abnahme der Transkriptmenge von VI (vgl. Abb. 19) unabhängig vom Einfluß des Steroidhormons stattfindet. Dieses Ergebnis wird durch den Nachweis von VI in Speicheldrüsen-RNA aus *ecd¹*-Larven bestätigt. In Speicheldrüsen aus 1(1)t435-Larven ist VI ebenfalls vorhanden (Daten nicht gezeigt) (s. 3.1.3).

3.1.7. Zusammenfassung der Transkriptanalyse

In Tab. 1 sind die Ergebnisse der Transkriptanalyse zusammengestellt. Es zeigte sich, daß in 74F-DNA eine Vielzahl von Transkripten codiert wird. Einige dieser Transkripte unterliegen einer gewebespezifischen und ecdysteroidunabhängigen Regulation. Insgesamt wurden acht Transkripte in Speicheldrüsen und Fettkörpern von Larven des 3. Häutungsstadiums nachgewiesen. Vier davon sind in beiden Geweben vorhanden (II, III, IV und VIII). Je ein Transkript ist nur in Speicheldrüsen (VII) oder nur im Fettkörper nachweisbar (V). Zwei Transkripte werden überwiegend in Speicheldrüsen synthetisiert.

Bei Inkubation des Gewebes mit und ohne Hormon nimmt die Transkriptmenge des einen (I) zu und die des anderen ab (VI).

Abb. 21 zeigt eine Restriktionskarte der untersuchten genomischen DNA. Die Restriktionsfragmente, die mit den den erwähnten Transkripten hybridisieren, sind eingezeichnet.

Nach den bisherigen Ergebnissen kann keine Aussage darüber gemacht werden, wie groß die transkribierten Bereiche innerhalb der DNA jeweils sind und wie weit sie sich möglicherweise noch in benachbarte DNA-Fragmente erstrecken.

Tab. 1: Transkripte aus 74F, die in Speicheldrüsen- und Fettkörper-RNA von Larven des 3. Häutungsstadiums nachweisbar sind

Transkript	Größe (in kB)	genomische DNA	vorhanden in	
			Sp-RNA	Fk-RNA
I	ca. 1,5	λ MOT 6	++	(+)
II	ca. 5	λ MOT 4	+	+
III	ca. 2,7	λ MOT 4	+	+
IV	ca. 1,9	λ MOT 4	+	+
V	ca. 1,7	λ MOT 11	-	+
VI	ca. 0,8-0,9	λ MOT 11/13	+++	(+)
VII	ca. 6	λ MOT 13	(+)	-
VIII	ca. 2	λ MOT 13	+	+

Sp : Speicheldrüsen

Fk : Fettkörper

+: Transkript in dieser RNA-Spezies vorhanden

(+): Transkript in dieser RNA-Spezies in geringer Konzentration vorhanden

- : Transkript in dieser RNA-Spezies nicht vorhanden

* : Zunahme der Transkriptmenge bei Inkubation des Gewebes mit und ohne Hormon

** : Abnahme der Transkriptmenge bei Inkubation des Gewebes mit und ohne Hormon



Abb. 21: Übersichtsrestriktionskarte der 74F-DNA und Lokalisation darin codierter Transkripte (s. Tab. 1)

Restriktionsenzyme: E = Eco RI
B = Bam HI
H = Hind III

Zahlenangaben in kbP

(-) Restriktionsfragmente, die mit den angegebenen Transkripten (I...VII) hybridisieren

3.2. Isolierung von cDNA-Klonen

Nachdem die Transkriptanalyse (s. 3.1.) gezeigt hatte, daß mehrere, z.T. gewebespezifisch exprimierte Gene vorhanden sind, wurden zu einigen davon cDNA-Klone isoliert, um mit ihrer Hilfe einen Ansatz für eine genauere Charakterisierung der untersuchten DNA zu erhalten.

Die λ -Phagen der zur Verfügung stehenden cDNA-Bibliotheken wurden nach Bestimmung des Phagentiters mit dem entsprechenden Bakterienstamm (s. 2.8.1.) auf 10 mM $MgCl_2$ enthaltende LB-Platten ausplattiert. Herstellung von Filterabzügen, Plaquehybridisierung und Vereinzelung positiver Klone sind in 2.8.2. und 2.8.3. beschrieben.

3.2.1. cDNA-Klone zu Transkript I

Transkript I wird zumindest teilweise von der DNA des 3 kBp-Bam HI-Hind III-Fragments aus λ MOT 6 codiert (Bezeichnung des Subklons: Pe2, s. Abb. 22 und 3.1.3). Für die Suche nach cDNA-Klonen zu I wurden 230.000 Phagen der cDNA-Bibliothek E (s. 2.8.1.) auf insgesamt 14 Petrischalen (Ø 145 mm) ausplattiert. Die Phagen wurden auf Nylonfilter transferiert und mit "nick-translatierter" Pe2-DNA über Nacht bei 65°C hybridisiert ($9,4 \times 10^7$ cpm/ μ g; $1,6 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung). Ausgehend von dieser Hybridisierung und mit den sich anschließenden weiteren Arbeitsschritten (s. 2.8.2. und 2.8.3.) konnten vier cDNA-Klone mit insertierter DNA unterschiedlicher Länge isoliert werden: Re4 (ca. 850 Bp), Re7 (ca. 550 Bp), Re15 (ca. 780 Bp) und Re16 (ca. 700 Bp).

Die Homologie dieser positiven Klone zu der genomischen DNA wurde durch eine Southern-Blot-Analyse mit radioaktiv markierter Pe2-DNA überprüft und bestätigt (s. 2.5.1. und 2.6.1.). Umgekehrt wurde die insertierte DNA des größten cDNA-Klons (Re4) isoliert, "nick-translatiert" und an die immobilisierte DNA der λ -Phagen mit insertierter genomischer DNA MOT 13, 11, 6 (mit Eco RI und Bam HI verdaut) und MOT 4 (mit Eco RI verdaut) hybridisiert. Dabei folgt aus einem Hybridisierungssignal großer Intensität, daß der überwiegende

Teil von Re4 aus dem 5,6 kBp-Bam HI-Eco RI-Fragment, das Pe2 enthält, stammt. Ein Hybridisierungssignal mit weitaus geringerer Intensität zeigt, daß sich die für Re4 codierende DNA auch in das benachbarte 4 kBp-Bam HI-Bam HI-Fragment erstreckt (s. Abb. 22). In der restlichen 74F-DNA wurde keine weitere signifikante Homologie zu Re4 gefunden.

Die tatsächliche Zugehörigkeit der cDNA-Klone zu dem vorwiegend in Speicheldrüsen synthetisierten Transkript I wurde durch die Hybridisierung radioaktiv markierter Re4-DNA an immobilisierte RNA aus inkubierten Speicheldrüsen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

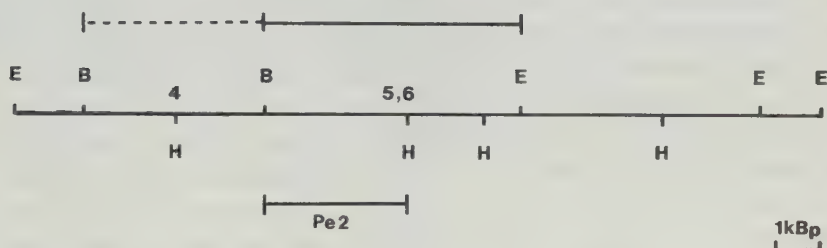


Abb. 22: Übersichtsrestriktionskarte von λ MOT 6

Restriktionsenzyme: E = Eco RI
B = Bam HI
H = Hind III

(-) starkes Hybridisierungssignal mit Re4
(...) schwaches Hybridisierungssignal mit Re4

3.2.2. cDNA-Klone zu Transkript VII und VIII

Aus 100.000 λ -Phagen der cDNA-Bibliothek E auf insgesamt 6 Platten (Ø 145 mm) (s. 2.8.1.) konnten durch Hybridisierung des "nick-translatierten" 2 kBp-Eco RI-Eco RI-Fragments aus λ MOT 13 ($7,4 \times 10^7$ cpm/ μ g; $2,5 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung; 16 Stunden bei 65°C, s. 2.8.2. und 2.8.3.) drei cDNA-Klone unterschiedlicher Größe isoliert werden: 2-11-g (ca. 2,3 kBp insertierte DNA), 2-13-a (ca. 1,3 kBp) und 2-6-e (ca. 1 kBp). Eine genaue genomische Lokalisation dieser

cDNA-Klone wurde nicht durchgeführt. Es wurde jedoch nachgewiesen, daß die cDNA-Klone zu dem 2 kBp-Eco RI-Eco RI-Fragment tatsächlich homolog sind und keine gemeinsamen, durch Hybridisierung an immobilisierte DNA nachweisbaren Sequenzen mit dem benachbarten 7 kBp-Eco RI-Eco RI-Fragment haben (s. Abb. 23).

Abb. 24 zeigt die Hybridisierung der radioaktiv markierten DNA von 2-11-g an immobilisierte Gesamt-RNA aus Embryonen und PS1-Speicheldrüsen. In der Gelbahn der Embryonen-RNA sind zwei relativ schwache Hybridisierungssignale zu erkennen. Sie entsprechen den Transkriptlängen von ca. 2 kB und 6 kB. Dagegen tritt in Speicheldrüsen-RNA ein starkes Hybridisierungssignal auf, das sich über die halbe Gelbahn hinzieht und auch oberhalb von 6 kB noch sehr intensiv ist. Das Maximum der Filmschwärzung liegt bei ca. 6 kB. In Höhe von 2 kB ist nur eine sehr schwache Hybridisierung zu sehen. Die Größe der mit 2-11-g hybridisierenden Transkripte und die "Form" des Hybridisierungssignals, d.h. die Verteilung der Filmschwärzung über einen großen Bereich der Gelbahn, lassen den Schluß zu, daß es sich bei den oben beschriebenen λ -Klonen um cDNA zu den Transkripten VII und VIII handelt (vgl. Abb. 24A und 16A: Hybridisierung von λ MOT 13-DNA an immobilisierte RNA aus Speicheldrüsen und Fettkörpern).

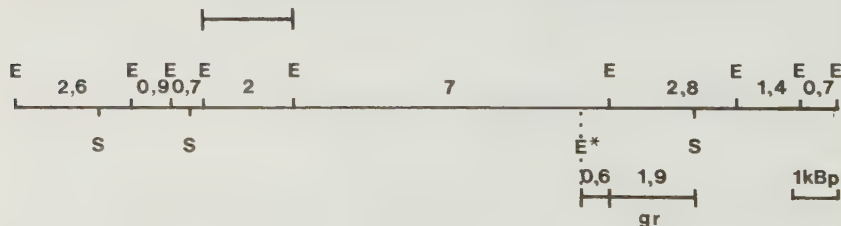


Abb. 23: Übersichtsrestriktionskarte von λ MOT 13

Restriktionsenzyme: E = Eco RI
S = Sal I

(-) genomisches Fragment, zu dem die Klone 2-11-g, 2-13-a und 2-6-e homolog sind

Neben den oben beschriebenen cDNA-Klonen konnte ein weiterer λ -Phage isoliert werden, dessen insertierte DNA zu dem benachbarten 7 kBp-Eco RI-Eco RI-Fragment von λ MOT 13 (s. Abb. 23) homolog ist (Bezeichnung: 7-1-d, 0,6 kBp insertierte DNA). Er wurde durch die Hybridisierung des radioaktiv mar-

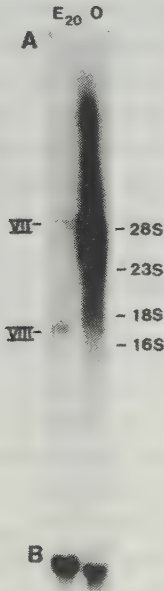


Abb. 24: Autoradiogramm der Hybridisierung von 2-11-g an immobilisierte RNA aus Embryonen und PS1-Speicheldrüsen

s. Legende zu Abb. 3

E20: RNA aus höchstens 20 Stunden alten Embryonen
(s. 2.4.1.)

0 : RNA aus PS1-Speicheldrüsen (s. 2.4.2.1.)

A: Hybridisierung des "nick-translatierten" 2,3 kBp-Fragments von 2-11-g: 65 Stunden bei 42°C;
spez. Akt.: $1,5 \times 10^8$ cpm/ μ g; $3,8 \times 10^8$ cpm/ml
Hybridisierungslösung; Belichtungszeit: 2 Tage
(ohne Verstärkerfolie)

B: Hybridisierung von pTu56-DNA an diese RNA

kierten Fragments an 100.000 Phagen der cDNA-Bibliothek C (s. 2.8.1.) gefunden ("Nick-Translation", spez. Akt.: $4,2 \times 10^7$ cpm/ μ g; $1,4 \times 10^5$ cpm/ml Hybridisierungslösung; 15 Stunden bei 65°C). Kein cDNA-Klon aus 100.000 Phagen der zuvor verwendeten Bibliothek E zeigte Homologie zu diesem Fragment.

Der Klon 7-1-d hybridisiert weder mit 2-11-g, 2-13-a oder 2-6-e, noch mit RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern. Da er einer cDNA-Bibliothek aus Embryonen entstammt, gehört er vermutlich zu einem Gen, das entweder nicht in Larven des 3. Häutungsstadiums exprimiert wird oder dessen Expression in diesen Larven auf andere Gewebe als Speicheldrüsen und Fettkörper beschränkt ist.

3.2.3. cDNA-Klone zu Transkript VI

Die Hybridisierung des 1,9 kbp-EcoRI-Sal I-Fragments von λ MOT 13 (Bezeichnung des Subklons: gr) und des 0,6 kbp-EcoRI*-Eco RI-Fragments von λ MOT 11 an immobilisierte RNA hatte gezeigt, daß in diesen beiden Fragmenten für Transkript VI codierende DNA vorhanden ist (s. 3.1.5., 3.1.6. und Abb. 23). Es wurde zunächst in einer larvalen cDNA-Bibliothek (E, s. 2.8.1.) nach cDNA-Klonen zu VI gesucht. Die Hybridisierung des subklonierten, gr enthaltenden 2,8 kbp-Eco RI-Eco RI-Fragments an 800.000 Phagen von E blieb ebenso erfolglos, wie die Hybridisierung des 0,6 kbp-Eco RI*-Eco RI-Fragments an 230.000 Phagen von E. Als nächstes wurde die cDNA-Bibliothek C benutzt, da gezeigt worden war, daß VI auch in Embryonen relativ häufig ist (s. 3.1.6.). Auch hier führte die Hybridisierung des subklonierten 2,8 kbp-Eco RI-Eco RI-Fragments an 560.000 Phagen und des 0,6 kbp-Eco RI*-Eco RI-Fragments an 230.000 Phagen von C nicht zu der Isolierung eines cDNA-Klons. Erst der Einsatz von cDNA-Bibliothek A war erfolgreich. A ist aus RNA höchstens eine Stunde alter Embryonen hergestellt, in denen ausschließlich maternal transkribierte RNA vorliegt (Rosenberg et al., 1986). Weil Transkript VI in Oozyten sehr häufig ist (s. 3.1.6), bestanden gute Aussichten, in dieser Bibliothek einen VI entsprechenden cDNA-Klon zu finden. Radioaktiv markierte gr-DNA wurde

an 300.000 Phagen von A hybridisiert ("Nick-Translation", spez. Akt.: 9×10^7 cpm/ μ g; $2,3 \times 10^5$ cpm/ml Hybridisierungslösung; 18 Stunden bei 65°C). So konnten drei verschiedene cDNA-Klone isoliert werden: c1 (ca. 640 Bp und 620 Bp insertierte DNA), c12 (ca. 980 Bp) und c18 (ca. 500 Bp). Die insertierte DNA aller drei Klone (bei c1 nur das größere der beiden Fragmente) hybridisierte miteinander. In der gesamten untersuchten genomischen DNA waren die cDNA-Klone nur zu dem 1,9 kbp-Eco RI-Sal I-Fragment (gr) aus λ MOT 13 homolog. Das kleinere Fragment von c1 stammt nicht aus 74F. Seine genomische Herkunft wurde nicht geklärt.

Die insertierte DNA von c1 (640 Bp) und c12 wurde an immobilisierte RNA aus Speicheldrüsen hybridisiert, um zu überprüfen, ob diese cDNA-Klone tatsächlich zu Transkript VI gehören. Mit c1 tritt nur das erwartete Hybridisierungssignal von VI auf (Daten nicht gezeigt), während mit c12 ein zweites, bisher unbekanntes Transkript in Speicheldrüsen nachweisbar ist (Größe ca. 2 kB) (Abb. 25:X). Daraus folgt, daß in diesem cDNA-Klon Sequenzen enthalten sein müssen, die in keinem Zusammenhang zu Transkript VI stehen.

Die Hybridisierung des radioaktiv markierten c18-Fragments an immobilisierte polyadenylierte RNA (2 μ g) aus höchstens 4 Stunden alten Embryonen zeigt wiederum das erwartete Transkript VI. Erst bei sehr langer Expositionszeit des Autoradiogramms sind zwei weitere, äußerst schwache Hybridisierungssignale zu sehen, die einer Transkriptlänge von ca. 1,7 kB und 3 kB entsprechen (Daten nicht gezeigt). Ob es sich dabei um sehr seltene Transkripte handelt, die unter den Bedingungen der bisherigen Versuche (Einsatz von Gesamt-RNA statt polyadenylierter RNA) nicht nachgewiesen werden konnten oder um Primärprodukte des Transkriptionsvorgangs, kann anhand der Daten aus den bisherigen Experimenten nicht entschieden werden.

Die Klone c1, c12 und c18 wurden sequenziert (s. 3.3.2.).

Um weitere cDNA-Klone zu VI zu finden, die möglichst der ganzen Länge des Transkripts entsprechen sollten, wurde cDNA-Bibliothek D (aus RNA von Larven des 1. und 2. Häutungssta-

diums) verwendet, da VI auch im 1. Häutungsstadium häufig vertreten ist (s. 3.1.6.). Die Hybridisierung von radioaktiv markierter gr-DNA an 180.000 Phagen von D ("Nick-Translation", spez. Akt.: $1,8 \times 10^8$ cpm/ μ g; $5,3 \times 10^5$ cpm/ml Hybridisierungslösung; 16 Stunden bei 65°C) führte zu der Iso-

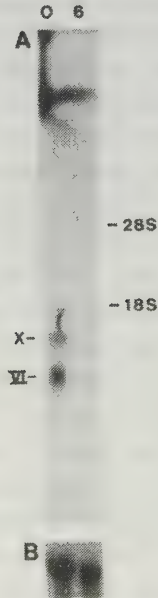


Abb. 25: Autoradiogramm der Hybridisierung von c12 an immobilisierte RNA aus inkubierten Speicheldrüsen

s. Legende zu Abb. 3

A: Hybridisierung des "nick-translatierten" c12-Fragments: 65 Stunden bei 42°C; spez. Akt.: 1×10^8 cpm/ μ g; $4,2 \times 10^8$ cpm/ml Hybridisierungslösung; Belichtungszeit: 7 Tage

B: Hybridisierung von pTu56-DNA an diese RNA

lierung fünf weiterer cDNA-Klone: c100 (ca. 0,7 kBp inserierte DNA), c101 (ca. 2 kBp), c105 (ca. 0,34 kBp), c107 (ca. 1,7 kBp) und c110 (ca. 2 kBp). Die fünf untereinander partiell homologen Klone hybridisierten nur an die genomische DNA von gr. Keiner der Klone zeigte jedoch Homologien zu dem Klon c18.

Der genomische Ursprung der cDNA-Klone wurde weiter eingegrenzt, indem die DNA des 2,8 kBp-Eco RI-Eco RI-Fragments, das gr enthält, mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und - nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf Nylonmembran - mit dem radioaktiv markierten Fragment von c100 bzw. c18 hybridisiert wurde. In Abb. 26 ist das Ergebnis dieses Versuchs zusammengefaßt. Da c18 (ca. 0,5 kBp) und c100 (ca. 0,7 kBp) an verschiedene genomische Restriktionsfragmente hybridisierten und aus den in 3.1.5. beschriebenen Experimenten bekannt war, daß ein Teil von Transkript VI auch in dem benachbarten 0,6 kBp-Eco RI*-Eco RI-Fragment codiert ist, war es wegen der Länge von VI (ca. 0,9 kB) sehr unwahrscheinlich, daß die Klone c100 bis c110 zu Transkript VI gehörten. Sie wurden im Verlauf der folgenden Untersuchungen nicht näher charakterisiert.

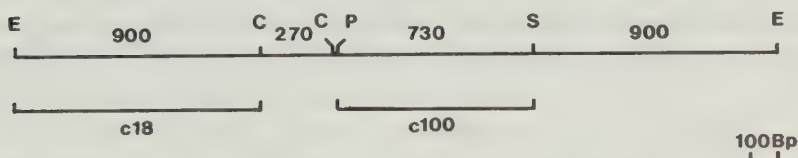


Abb. 26: Restriktionskarte des 2,8 kBp-Eco RI-Eco RI-Fragments aus λ MOT 13

Restriktionsenzyme: E = Eco RI
C = Cla I
P = Pvu II
S = Sal I

(-) mit c18 bzw. c100 hybridisierende Restriktionsfragmente

Für die weitere Suche nach cDNA-Klonen zu Transkript VI wurde c18 als Probe eingesetzt, um möglichst längere Klone zu finden. Aus cDNA-Bibliothek B, die von R. Seidel an diesem Lehrstuhl aus RNA von höchstens 4 Stunden alten Embryonen angefertigt worden war, konnten durch Hybridisierung mit radioaktiv markiertem c18-Fragment ("Nick-Translation", spez. Akt.: $1,3 \times 10^8$ cpm/ μ g; $1,2 \times 10^8$ cpm/ml Hybridisierungslösung; 16 Stunden bei 65°C) aus 100.000 Phagen zwei cDNA-Klone isoliert werden: c113 (ca. 0,5 kbp und 0,35 kbp) und c157 (ca. 0,5 kbp und 0,3 kbp). Beide Klone besitzen zwei insertierte Eco RI-Fragmente, von denen das größere jeweils mit c18 bzw. gr hybridisierte, während das kleinere zu dem 0,6 kbp-Eco RI*-Eco RI-Fragment homolog war (s. Abb. 23). Diese beiden cDNA-Klone wurden ebenfalls sequenziert (s. 3.3.2.).

3.3. Sequenzierung der cDNA-Klone zu Transkript VI und der zugehörigen genomischen DNA

DNA, die sequenziert werden sollte, wurde zunächst in einen M13-Vektor kloniert (s. 2.3.). Durch Einzel- und Doppelverdauungen mit verschiedenen Restriktionsenzymen und Auftrennung der Fragmente auf Agarosegelen wurde eine möglichst genaue Restriktionskarte der DNA angefertigt. Ziel war es, mit Hilfe der ermittelten Restriktionsschnittstellen überlappende, bis zu 500 Bp große Subklone der DNA herzustellen, die in beiden Richtungen sequenziert werden konnten. Dazu wurden als erstes Enzyme benutzt, die in der multiplen Klonierungsregion der verwendeten Vektoren schneiden (s. 2.3.3.). Ständen derartige Restriktionsschnittstellen nicht zur Verfügung, wurden Kartierungen mit Enzymen vorgenommen, die eine Sechs-Basenpaar-Erkennungssequenz haben und bei denen die erzeugten Fragmente in die multiple Klonierungsregion der Vektoren ligiert werden können. Waren auch solche Schnittstellen nicht vorhanden oder zu ungünstig gelegen, wurde das zu sequenzierende DNA-Fragment isoliert und mit Enzymen kartiert, die eine Vier-Basenpaar-Erkennungssequenz haben und somit häufiger schneiden. Anhand der so erstellten Restrik-

tionskarten wurden geeignete Enzyme ausgewählt und mit ihrer Hilfe Subfragmente der DNA kloniert (z.T. über Religationen, s. 2.3.4.). Durchführung der Sequenzierungsreaktionen, Elektrophorese und Autoradiografie sind in 2.9. ausführlich dargestellt.

3.3.1. Sequenzierung der genomischen DNA von Transkript VI

Folgende genomische DNA-Fragmente der λ -Klone MOT 13 bzw. 11 wurden sequenziert (s. Abb. 23):

0,6 kBp Eco RI*-Eco RI, 2,8 kBp Eco RI-Eco RI,
1,4 kBp Eco RI-Eco RI, 0,7 kBp Eco RI-Eco RI

In Abb. 27 sind Sequenzierungsstrategie und ermittelte Nukleotidsequenz dargestellt. Unterhalb der Restriktionskarte der DNA mit einigen der zu Subklonierungen benutzten Restriktionsschnittstellen sind Länge und Richtung der einzelnen Sequenzierungen in Form von Pfeilen dargestellt.

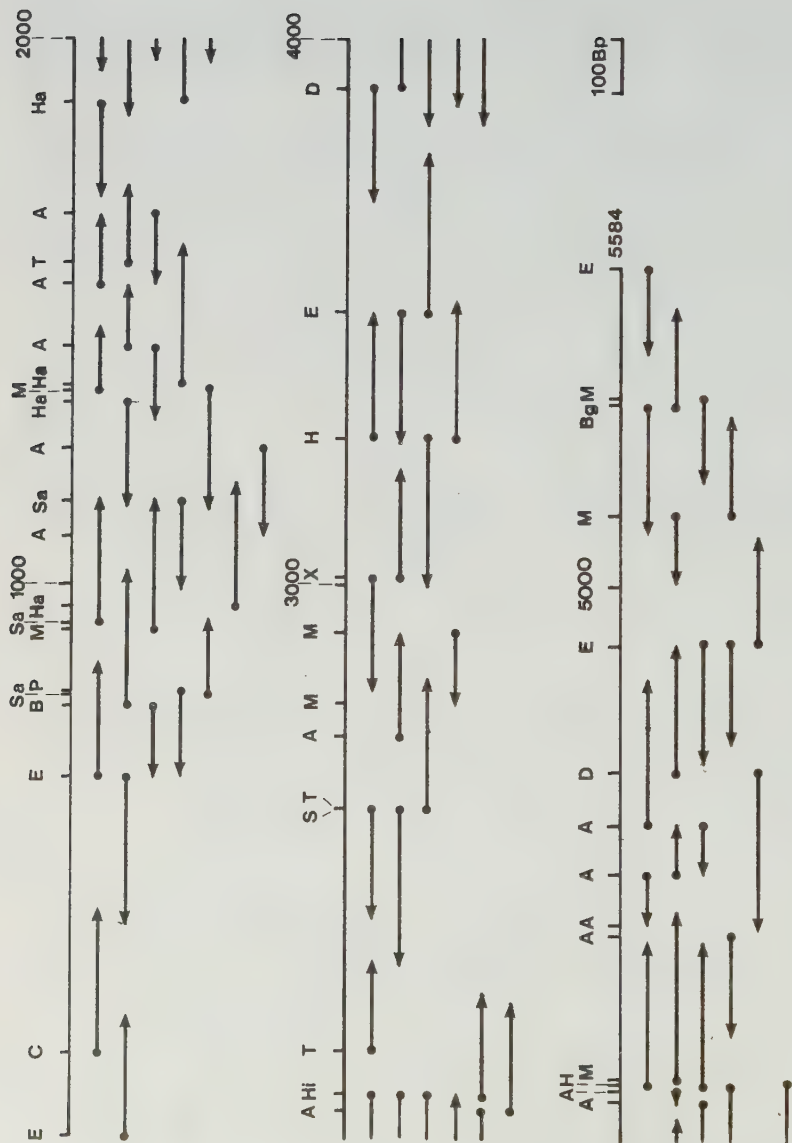
3.3.2. Sequenzierung der Klone c1, c12, c18, c113 und c157

Abb. 28 zeigt Restriktionskarten und Sequenzen der Klone c1, c12, c18 und c113, bei denen nur die zur Subklonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen eingezeichnet sind.

Abb. 27: Sequenzierungsstrategie und Nukleotidsequenz der distalen 5,6 kBp von λ MOT 13

Restriktionsenzyme:

A = Alu I	H = Hind III	S = Sal I
B = Bam HI	Ha = Hae III	Sa = Sau 3A
Bg = Bgl II	Hi = Hinc II	Ss = Sst I
D = Dra I	M = Msp I	T = Taq I
E = Eco RI	P = Pst I	X = Xho I



10	20	30	40	50	60
GAATTCATGC	TTGAGGACCC	CCACCATGTG	AGCCCACTAC	GTCACCTGCTG	ACGGCCACAAA
CTTAAGTACG	AACTCCTGGG	GGTGGTACAC	TCGGGTGATG	CAGTGACGAC	TGCCGGTGTT
70	80	90	100	110	120
AGGCGGGGGG	TGGTGTGATG	TCTTTGCGAT	AAGAATTTCG	GCTACAATGC	CGCGAATTTCG
TCCGCCCCCC	ACCACACTAC	AGAAACGCTA	TTCTTAAAGC	CGATGTTTACG	CGCGTTAAAC
130	140	150	160	170	180
TTGCCTCAGC	CGGGAACCTT	CCTTTGCCAT	CGATAACAAG	ATAACAAATA	AAATGATTTA
AACGGAGTCG	GCCCTTGAAA	GGAAACGGTA	GCTATTGTTC	TATTGTTTTAT	TTTACTAAAT
190	200	210	220	230	240
ATTTATACCT	ATGAATCGAA	AACTCCCACG	GCGTCGCATT	GCAGTAACTG	GCTTTTCAGT
TAAATATGAA	TACTTAGCTT	TTGAGGGTGC	CGCAGCGTAA	CGTCATTGAC	CGAAAAAGTCA
250	260	270	280	290	300
TACTCTCAAA	CTGTGTCCAC	AGCTTTTCCG	CGGTGGCGCG	TAGAAAAGCT	CACGCCACCT
ATGAGAGTTT	GACACAGGTG	TGAAAAAGGC	GCCACCGCGC	ATCTTTTCGA	GTGCGGTGGA
310	320	330	340	350	360
TGCAGTGCTC	CTAAAAACTT	TTAAAAACTA	AATCTCTTTA	ATTAGATTAG	ATCTCTCATA
ACGTCACCGA	GATTTTTGAA	AATTTTTGAT	TTAGAGAAAT	TAATCTAATC	TAGAGAGTAT
370	380	390	400	410	420
TTACAAGCCA	ATTTATGTAT	ATCCCTGATC	TTGAATGTTT	ATATTTTTAA	TTCATGGCTT
AATGTTCCGT	TAAATACATA	TAGGGACTAG	AACTTACAAA	TATAAAAAAT	AAGTACCGAA
430	440	450	460	470	480
GACATCCAGC	AAGTTGGAGT	ACTAATCTCA	CGTCTACACA	TTTTAGTTCT	TGAACAGAAT
CTGTAGGGTC	TTCAACCTCA	TGATTAGAGT	GCAGATGTGT	AAAAACAAGA	ACTTGTCTTA
490	500	510	520	530	540
ATATTTAACA	AAATATAAAT	ATTCAATGAT	TTTGAAAAGAA	AATGGTACGG	TCTATAGTTT
TATAAAATTGT	TTTATATTTA	TAAGTTACTA	AAACTTTCTT	TTACCATGCC	AGATATCAAA
550	560	570	580	590	600
TGTTTCGGAT	TTTATTAATC	TACAGTTTTC	GTATGCTTAT	TTTAGATCCT	GTTGGTTTCG
ACAAAAGCCTA	AAATAATTAG	ATGTCAAAAC	CATACGAATA	AAATCTAGGA	CAACCAAGCG
610	620	630	640	650	660
AGGTAATCTT	CATCGTCATC	TCCATCGGCA	TCCTCCACCA	CGCTGTACGA	ATTCTTGCCG
TCCATTAGAA	GTAGCAGTAG	AGGTAGCCGT	AGGAGGTGGT	GCGACATGCT	TAAGAACCGC
670	680	690	700	710	720
GCACCATCCT	TGGCCAGATG	CGTTTCGAAG	AACTCCTCGA	CAGTGTCTGT	GTTCCACTTG
CGTGGTAGGA	ACCGGTCTAC	GCAAAAGCTT	TTGAGGAGCT	GTCACAGACA	CAAGGTGAAC
730	740	750	760	770	780
GTTATGGACA	ACGTCTCCTG	CACTTTGCCA	CTGGCATCTA	GGAGCTTTAA	CCAGCGGGAT
CAATACCTGT	TGCAGAGGAC	GTGAAACGGT	GACCGTAGAT	CCTCGAAATT	GGTCGCCCTA
790	800	810	820	830	840
CCAGTCCTCT	TACGTATTTG	ATCTGCAGGT	TGGGGAACCT	GGCAGGTCCG	CCGCTTTGAA
GGTCAGGAGA	ATGCATAAAC	TAGACGTCCA	ACCCCTTGAA	CCGTCCAGCC	GGCGAAACTT
850	860	870	880	890	900
TAAAGGCCTG	AATCTGCGGA	TAGGCCCGGA	ATTGCAAGGT	GCACACTCAG	AATTGCCTTG
ATTTCGGGAC	TTAGACGCCT	ATCCGGGCCT	TAAACGTCCA	CGTGTGAGTC	TTAACGGAAAC

910	920	930	940	950	960
GCATATGTCC	GCTGTGCCGC	CGGCTGCTGA	TCCAAAAGTGC	AGCATTTGCTT	ACACTGAGGC
CGTATACAGG	CGACACGGCG	GCCGACGACT	AGGTTTCACG	TCGTAACGAA	TGTGACTCCG
970	980	990	1000	1010	1020
CTGAAATGTT	AAAAATGTTT	TGGATGAATA	AAAAAGAGCA	ATGGGCTCAA	GCAGAAACTA
GACTTTACAA	TTTTTACAAA	ACCTACTTAT	TTTTTCTCGT	TACCCGAGTT	CGTCTTTGAT
1030	1040	1050	1060	1070	1080
TAAAAAGTTA	ATATAATTTT	TGTTATTAAA	AACTGAAGGA	AGAATCATAT	TTAGTCAGTG
ATTTTTCAAT	TATATTAATA	ACAATAATTT	TTGACTTCCT	TCTTAGTATA	AATCAGTCAC
1090	1100	1110	1120	1130	1140
GTATGGAGGA	GCTTACTAAG	TCAAGCTAAG	CATTTTGTGT	TGGAATATTT	AAAAATGAGGT
CATACCTCCT	CGAATGATTC	AGTTCGATTC	GTAACCAACCA	ACCTTATAAA	TTTTACTCCA
1150	1160	1170	1180	1190	1200
ATGAAATTTA	ACCTGATCTA	ATTAGATTAA	CATATTAAAT	AAACAATTTT	CAGGTCCTCT
TACTTTAAAT	TGGACTAGAT	TAATCTAATT	GTATAATTTA	TTTGTTAAAA	GTCCAGAAGA
1210	1220	1230	1240	1250	1260
TATGGAATGA	TTATAGCATA	GTTTATGGGT	ATCTTTACAA	CTCCAAAGCT	AGATTAAATTA
ATACCTTACT	AATATCGTAT	CAAGTACCCA	TAGAAATGTT	GAGGTTTCGA	TCTAATTAAT
1270	1280	1290	1300	1310	1320
AATGTTATTG	AACCCACTTG	ATGGTATCCA	ATCCGAAATC	ATCCAGTTTT	TCGCAACTGG
TTACAATAAC	TTGGGTGAAC	TACCATAGGT	TAGGCTTTAG	TAGGTCAAAA	AGCGTTGACC
1330	1340	1350	1360	1370	1380
AACACATTAA	CTGGGCCCTTA	ATAAACCCCA	ACGCCCGGCA	GTCCGGCGCC	GTCAATTCCG
TTGTGTAATT	GACCCGGAAT	TATTTTGGGT	TGCGGGCCGT	CAGCCGCCGG	CAGTTAAGCC
1390	1400	1410	1420	1430	1440
CTTGAAATTTG	CTGGCACTGT	AGGGTATAAA	ATATATATTA	AAAAATGTC	TTAGCTTCAG
GAACCTTAAAC	GACCGTGACA	TCCCATATTT	TATATATAAT	TTTTGTACAG	AATCGAAGTC
1450	1460	1470	1480	1490	1500
ACATAACTTA	CACITAAAGC	CAGTAGAAGA	AATATAGCAC	ATTTATGCAT	TTTTGTGGCT
TGTATTGAAT	GTGAATTTTC	GTCATCTTCT	TTATATCGTG	TAAATACGTA	AAAAACCCGA
1510	1520	1530	1540	1550	1560
AATTCTAATT	AAATTTACTA	CGTCCACGTC	GTTGTTTACA	TTTTCTTAGC	TTAGTGATGA
TTAAGATTAA	TTTAAATGAT	GCAGGTGCAG	CAACAAATGT	AAAAAGATCG	AATCACTACT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
GTAGAAGGGA	AAATAACATT	ATTTAGGCTT	ATCGATTATA	TTCCGGTTGC	TTGCTTTTTC
CATCTTCCCT	TTTATTGTAA	TAAATCCGAA	TAGCTAATAT	AAGCCCAACG	AACAGAAAAAG
1630	1640	1650	1660	1670	1680
ATCGTTTAGG	GTATTCGGTA	TACTGTTTAT	GAATTAGACA	ATTAATCAAA	CTTTTGAACA
TAGCAAATCC	CATAAGGCAT	ATGACAAATA	CTTAATCTGT	TAATTAGTTT	GAAAACTTGT
1690	1700	1710	1720	1730	1740
GCTTTCAATA	AACTTATTAT	TATTATTTCT	TGATATTTTT	CAGCAATTGT	AAACTTTTGT
CGAAAGTTAT	TTGAATAATA	ATAATAAAGA	ACTATAAAAA	GTCGTTAAAC	TTTGAAAAACA
1750	1760	1770	1780	1790	1800
CACTATAAAA	GTGTACAAAA	TAATTTTCAG	TTTTTATATT	CAAGTAGCCA	AGTTTTATTT
GTGATATTTT	CACATGTTTT	ATTAAAGTCC	AAAAATATAA	GTTTCATGCGT	TCAAATAAAA

1810	1820	1830	1840	1850	1860
CCGATGTTAA	TAACTAATTT	CAATGTGATT	CGATAGCTTA	TCACGCITTA	ATCCCTACAA
GGCTACAATT	ATTGATTAAT	GTTACTACTAA	GCTATCGAAT	AGTGCGAATG	TAGGGATGTT
1870	1880	1890	1900	1910	1920
TCGATACGGA	CTGCCACGCA	GCTGGCCACC	ACTAGCTCAG	AAATCGAAGA	TTATTCGTGG
AGCTATGCCT	GACGGGTGCT	CGACCGGTGG	TGATCGAGTC	TTTAGCTTCT	AATAAGCACC
1930	1940	1950	1960	1970	1980
TGGTGCAATTT	TGTTTTTTTC	GCTTCGCTCG	CGAAGTGAGC	CCAGTTTTAA	ATTATTTAAA
ACCACGTAAA	ACAAAAAAG	CGAAGCGAGC	GCTTCACTCG	GGTCAAAATT	TAATAAATTT
1990	2000	2010	2020	2030	2040
TTGCGTATAG	TGAAGCCACT	TGAAAGCGAA	ACGCCTACTG	TCGCAGTTCT	GCCAAAAAAC
AACGCATATC	ACTTCGGTGA	ACTTTCGCTT	TGCGGATGAC	AGCGTCAAGA	CGGTTTTTTG
2050	2060	2070	2080	2090	2100
CAACAGTATT	AGCTGTGTGC	GTGTTTGGCA	ACAACAAGTC	AAACAAAATTC	GAACAAAAATC
GTTGTCTATA	TCGACACACG	CACAAACCGT	TGTTGTTCAG	TTGTTTTAAG	CTTGTTTTAG
2110	2120	2130	2140	2150	2160
AATAAAACGG	AAACGTGAGA	GAGCGCTGCG	CAAAAGAGAA	AAGCGAAACGA	ATCGCAATCG
TTATTTTGCC	TTTGCACTCT	CTCGCGACGC	GTTTTCTCTT	TTCGCTTGCT	TAGCGTTAGC
2170	2180	2190	2200	2210	2220
ACCAACGCAT	AGAAGAAAAC	AAGGTGAATA	AATAGAACAT	GGCATAGAAA	AGGCGAACTA
TGGTTGCGTA	TCTTCTTTTG	TTCCACTTAT	TTATCTTGTA	CCGTATCTTT	TCCGCTTGAT
2230	2240	2250	2260	2270	2280
GAATCAAAATC	GAATTAATAAT	CGGGTACAGA	AATAGACGTG	AAAAGAAAAG	GCGAAGAAAAG
CTTAGTTTAG	CTTAATTTTA	GCCCATGTCT	TTATCTGCAC	TTTTCTTTCC	CGCTTCTTTT
2290	2300	2310	2320	2330	2340
GGAAACAAAT	AACCGTTACA	GGAGCACTCC	TGGAGATTTA	AGGCTCTCTC	TCCCCCTCCT
CCTTTGTTTA	TTGGCAATGT	CCTCGTGAGG	ACCTCTAAAT	TCCGAGAGAG	AGGGGGAGGA
2350	2360	2370	2380	2390	2400
CAGCACTTTA	GCCCCAGTTG	TGCGTTGTGT	GTGTACATGT	GTTTATGTTT	TGTTTAGCAC
GTCGTGAAAT	CGGGGTCAAC	ACGCAACACA	CACATGTACA	CAAAATACAA	ACAAATCGTG
2410	2420	2430	2440	2450	2460
ATTAATAATC	TTAATTCTGC	TAGATTTGCG	CACTCAGGTG	CTAAACGCCTA	AAAAAAAAAT
TAATTATTAG	AATTAAGACG	ATCTAAAGCG	GTGAGTCCAC	GATTTGCGAT	TTTTTTTTTA
2470	2480	2490	2500	2510	2520
GCACACTCCG	ATAAGTCTAC	CCCTGTGTGC	GTGTACTTGT	TTATTTAATT	CATATTTACT
CGTGTGAGGC	TATTCAGATG	GGGACACAGC	CACATGAACA	AATAAATTAA	GTATAAATGA
2530	2540	2550	2560	2570	2580
CAAGTAAAT	AATTCAATTTG	CCCTTGTTACA	ATAACAACAA	GCGCCGTTTG	CTTGAAACT
GTTCAATTTA	TTAAGTAAAC	GGGAACATGT	TATTGTTGTT	CGCGGCAAAAC	GAACCTTTGA
2590	2600	2610	2620	2630	2640
CGTTCTCGCA	GTCGACCGCC	TCCCTCTTCG	CTCCTAATCT	TATTCCTTCT	CTATCCACT
GCAAGAGCGT	CAGCTGGCGG	AGGGAGAAAG	GAGGATTA7A	ATAAGAAAAG	GATAAGGTGA
2650	2660	2670	2680	2690	2700
GCAATACCAT	GCAGCTGTGC	GTGCCTGTGT	GTTTTCAATC	AATCCAGGAA	ATTGCCCTTT
CGTTATGGTA	CGTCGACAGC	CACGGACACA	CAAAAGTAAG	TTAGGTCTTT	TAACGGGGAA

2710	2720	2730	2740	2750	2760
GAGAGACCTT	TCCATTGAGA	CAGCTCCATC	TGCATCTTCT	TTGAGAGCTT	TTCCGCTTGC
CTCTCTGGAA	AGGTAAGTCT	GTCGAGGTAG	ACGTAGAAGA	AAAGCTCGAAG	AAAGCGAAGC
2770	2780	2790	2800	2810	2820
ATCTTCATCC	TCTCTCTTGT	GCTCCGGTCC	CGTTTAATGG	TTTACTTTAT	GCTTTATTCC
TAGAAGTAGG	AGAGAGAACA	CGAGGCCAGG	GCAAAATTACC	AAATGAAATA	CGAAATAAGG
2830	2840	2850	2860	2870	2880
ACTGATGCCT	CCTCTATCGC	CCTCTCCCTT	GCGCACACCT	GCTGCTTGGC	AGCTGTCCAC
TGACTACGGA	GGAGATAGCG	GGAGAGGGAA	CGCGTGTGGA	CGACGAACCG	TCGACAGGTG
2890	2900	2910	2920	2930	2940
GCGGTGCAAT	TTCTTATCAC	CGAACAACCT	CGGGCTGAAA	CCCAAAACCT	GGCCCAAACT
CGCGAGTTTA	AAGAATAGTG	GCTTGTTTGA	GGCCGACTTT	GGGTTTTGGA	CCGGGTTTGA
2950	2960	2970	2980	2990	3000
GCGTGTGTAC	TTTTCCACGG	CAAATTCCTT	AAATTCACAC	GCCTTTTGTG	ACGGCCCTGT
CGCAACAATG	AAAAGGTGCC	GTTTAAGGGA	TTAAAGGTTG	CGGAAAAACG	TGCCGGGACA
3010	3020	3030	3040	3050	3060
TGCTTTCTCC	CTCTCGAGAG	CTCTAACTCC	CTCTCCAATC	CTATTTTATC	ATACACGCAT
ACGAAAAGAG	GAGAGCTCTC	GAGATTGAGG	GAGAGGTTAG	GATAAAAAATG	TATGTGCGTA
3070	3080	3090	3100	3110	3120
ACGCAGTAAA	ACTTGGCTAT	GACAAACCCAC	ATATTATTCT	ATAGATACCA	AATACTGTTT
TGCGTCATTT	TGAACCGATA	CTGTTTGGTG	TATAATAAGA	TATCTATGGT	TTATGACAAA
3130	3140	3150	3160	3170	3180
TTTTAATACT	GTATATTGTT	AGATACAAAA	ACACTTTTGA	ATTACAAATC	CAGATTGGAAT
AAAATTATGA	CATATAACAA	TCTATGTTTT	TGTGAAAACT	TAATGTTTAG	GTCTACCTTA
3190	3200	3210	3220	3230	3240
TATTAAAAAA	AAATATGTAT	ATATTTTGCA	CAAAATTCTT	CATCTGTTTC	AAAGGTAATT
ATAATTTTTT	TTTATACATA	TATAAAACGT	GTTTTAAAGA	GTAGACAAAG	TTTCCATTAA
3250	3260	3270	3280	3290	3300
CCATATGTGT	TGACATTTGA	AATGTAAAAAG	CTTTTCTATT	TATTTTAAAG	ATTCAAAAAT
GGTATACACA	ACTGTAAACT	TTACATTTTC	GAAAAAGATA	ATAAAATTTC	TAAGTTTTTA
3310	3320	3330	3340	3350	3360
TATTTTTAGC	CGAATGCATA	CGCATTAATA	GCAAAATCGAT	TTATTCGGTT	TAAACATCTA
ATAAAAAATCG	GCTTACGTAT	GCGTAATTTT	CGTTTAGCTA	AATAAGCCAA	ATTTGTAGAT
3370	3380	3390	3400	3410	3420
TTGTTTTTCA	ATGGAATAAC	CAGTGTATTT	TCCAGAGAAC	CTTACCTAAG	TTTTTATATG
AACAAAAAGT	TACCTTTTTG	GTCACATAAA	AGGTCTCTTG	GAATGGATTG	AAAAATATAC
3430	3440	3450	3460	3470	3480
TATATATTAC	ATTCAAAAAT	ATTATATGCC	AGCTTTGAAG	CATGTTAAACG	ATAAGGTGAC
ATATATAATG	TAAGTTTTAT	TAATATACGG	TCGAAACTTC	GTACAATTGC	TATTCACATG
3490	3500	3510	3520	3530	3540
TTGAGCCCGA	TTGTTAGTGA	ATTCTTAAAA	AATAAGAAATG	AGCAAAAGTCG	CTTTACATTG
AACTCGGGCT	AACAATCACT	TAAGAATTTT	TTATTCCTTAC	TCGTTTCAGC	GAAATGTAAC
3550	3560	3570	3580	3590	3600
GGATTGATTG	TGAAATCCTC	CAAATCTTTG	TGTGTCACCTA	TAGAGTCTTA	TTTAAAAATGA
CCTAACTAAC	ACTTTAGGAG	GTTTAGAAAC	ACACAGTGAT	ATCTCAGAAAT	AAATTTTACT

3610	3620	3630	3640	3650	3660
TATTACAAA	TGTATTGGCA	AAACGCAGAT	AAGTTCAACT	GTACAATGTG	CAATCTCTCG
ATAATGGTTT	ACATAACCGT	TTTGCCTCTA	TTCAGTTTGA	CATGTTACAC	GTTAGAGAGC
3670	3680	3690	3700	3710	3720
GTTTCGCGCA	ATTTTGCTAT	TTTTCAAAATG	CCGCGACATC	TGACTCATCC	ACAGGTAAC
CAAAAGCGCGT	TAAAAACGATA	AAAAGTTTAC	GGGCGTGTAG	ACTGAGTAGG	TGTCACATTGA
3730	3740	3750	3760	3770	3780
GTAATTACTG	CCTAGCATCC	ACTTGCTTTC	CGCACCTGTG	GATGGTATTT	GTCACCTTAT
CATTAATGAC	GGATCGTAGG	TGAACGAAAG	CGGTGGACAC	CTACCATAAA	CAGTGGAATA
3790	3800	3810	3820	3830	3840
CAATACGGTT	TCTCTGTGTT	GACTGTGATT	TGATTTTAGA	TATTCCTGCG	CACGAAAAAA
GTTATGCCAA	AGAGACACAA	CTGACACTAA	ACTAAAATCT	ATAAGGACGC	GTGCTTTTTT
3850	3860	3870	3880	3890	3900
ATTGGACACC	TCTAAATTTA	ATTATACAAA	TAGTACTGTT	TATGTTTTCC	TATATTTATT
TAACCTGTGG	AGATTTAAAT	TAAATATGTT	ATCATGACAA	ATACAAAAGG	ATATAAATAA
3910	3920	3930	3940	3950	3960
GAAGTATTTT	AAAGTGTGTA	TACAAAAGTA	ATTATTGAGT	GCATATGAAA	CCAAAGTCTT
CTTCATAAAA	TTTCACACAT	ATGTTTTTCAT	TAATAACTCA	CGTATACTTT	GGTTTCAGAA
3970	3980	3990	4000	4010	4020
TTGTATTCTG	ATACCAAAAA	TCATATCCAT	ATATGATATC	CAAAATTTAT	TTCTGTGTAC
AACATAAGAC	TATGGTTTTT	AGTATAGGTA	TATACTATAG	GTTTTAAATA	AAGACACATG
4030	4040	4050	4060	4070	4080
TCTGCTGTTT	GTGAGGTCAA	TTTTGATAAG	CCACCAGGTG	CTCATTTAGC	TCGTTGGGCG
AGACGACAAA	CACCTCCAGT	AAAACATATC	GGTGGTCCAC	GAGTAAATCG	AGCAACCQCG
4090	4100	4110	4120	4130	4140
CTATTAGCTC	ATTATTCCAA	GCTTACGTCC	GGCTCACCCA	CATACCCACA	GATATAAAAA
GATAATCGAG	TAATAAGGTT	CGAATGCAGG	CCGAGTGGGT	GTATGGGTGT	CTATATTTTT
4150	4160	4170	4180	4190	4200
AAAACATATC	AAAAAACCCA	TATATGCACT	CGCAGAAATT	AGGGCCAACT	TAAGCCCACT
TTTTGATATG	TTTTTTGGGT	ATATACGTGA	GCGTCTTTAA	TCCCAGTTGA	ATTCCGGTGA
4210	4220	4230	4240	4250	4260
CACGCAGTTT	CTTTCITTTCT	TTCTTTGGCT	TGAACTATTT	TTGTTTTGCT	CGTTTGGCTC
GTGCGTCAAA	GAAAGAAAAG	AAGAAACCGA	ACTTGATAAA	AAACAAAACGA	GCAAAACCGAG
4270	4280	4290	4300	4310	4320
CGTTTATATT	TCAATTGACC	GAAAGGTCAT	CTTAATTGCA	TTTGTGTTTT	GCGACTGTGCG
GCAAAATATA	AGTTAACTGG	CTTTCCAGTA	GAATTAACGT	AAACACAAAA	CGCTGACAGC
4330	4340	4350	4360	4370	4380
CACTGTCCTA	CTCGCACTCG	CACTCGCACT	CTTCTCCTGC	CATTTCAGCT	GTCAACTTCA
GTGACAGGAT	GAGCGTGAGC	GTGAGCGTGA	GAAGAGGACG	GTAAGTTCGA	CAGTTGAAGT
4390	4400	4410	4420	4430	4440
CTCGTGAGCT	TTGTTGTTGT	TATTTTTAGA	CGTAGGTGCG	TGCCACACAT	GTGATGGGAG
GAGCACTCGA	AAACAACAACA	ATAAAAAATCT	GCATCCACGC	ACGGTGTGTA	CACTACCCCTC
4450	4460	4470	4480	4490	4500
GAAAGGGNNA	ATTTTATGGG	GCITAGGGCT	CCGTTGAGCT	TTACAAAAGCA	ATTGGACACG
CTTTCNNNT	TAAAAATACC	CGAATCCCGA	GGCAACTCGA	AATGTTTCGT	TAACCTGTGC

4510	4520	4530	4540	4550	4560
GTTTAGTCCA	AGGACTCGCG	ACTGTGGATT	GAGATTCCGA	CTAGTGACGA	GAGTCCTAGA
CAAAATCAGGT	TCCTGAGCGC	TGACACCTAA	CTCTAAGGCT	GATCACTGCT	CTCAGGATCT
4570	4580	4590	4600	4610	4620
AAATAAAAGC	TAAATGCTAT	CTTATATATA	ATTGACTGTT	TGAAATAAAG	TACAAATATT
TTTATTTTCG	ATTTACGATA	GAATATATAT	TAACTGACAA	ACTTTATTTT	ATGTTTATAA
4630	4640	4650	4660	4670	4680
AGATTTAATG	TGCTAACATC	CAAAACAGGTG	ACGAAAAGCAA	ACTTTTAAAA	CGAAGTGTAT
TCTAAATTAC	ACGATTGTAG	GTTTGTCCAC	TGCTTTCGTT	TGAAAAATTT	GCTTCACATA
4690	4700	4710	4720	4730	4740
ATTTATTATA	ATTGCAACTG	TTTCGCTCTT	CTTTCCTTCA	CTTCCAAGTA	GAAGAATATA
TAAATAATAT	TAACTTTGAC	AAAGCGAGAA	GAAAGGAAGT	GAAGGTTTCT	CTTCTTATAT
4750	4760	4770	4780	4790	4800
ACTTTAGTTT	TGATTAATAA	TTGTAATATT	GCATGTTTGA	ATAAAAAAAT	AGTTCAATTT
TGAAATCAAA	ACTAATTATT	AACATTATAA	CGTACAAACT	TATTTTTTTT	TCAAAGTTAAA
4810	4820	4830	4840	4850	4860
CACTGACATA	TTTCCTAATA	TAAATTTAGA	CAGTTAAAGTT	GGCATGACTA	GCGTTTATTG
GTGACTGTAT	AAAGGATTAT	ATTTAAATCT	GTCAATTCAA	CCGTACTGAT	CGCAAAATAAC
4870	4880	4890	4900	4910	4920
AAAGCACTTA	GAAAGTTTTA	ATTTACGTTA	AGTGAATTTCT	TGGCTTTGGC	TGGCAGGCGG
TTTCGTGAAT	CTTTCAAAAA	TAAATGCAAT	TCACTTAAGA	ACCGAAAACG	ACCGTCCGGC
4930	4940	4950	4960	4970	4980
CTGCAAAACA	AAAACGAAAGT	GCAATTTAAAA	ACAAATCAAA	AATGTAAGCT	CGTGTTCCGG
GACGTTTTGT	TTTTGCTTCA	CGTTAAATTT	TGTTTAGTTT	TTACAATTGCA	GCACAAGCCC
4990	5000	5010	5020	5030	5040
TCTGTGTGGG	TTAATTGCCT	GCCTAGCACC	GCCAGCCGCC	TCCTTCTCAC	AATTACAACC
AGACACACCC	AATTAACGGA	CGGATCGTGG	CGGTCGGCGG	AGGAAGAGTG	TTAATGTGGG
5050	5060	5070	5080	5090	5100
TATGCTCCTC	GACCTAAGTG	AGAACGAGAA	ACAGAAAATC	GAATTTTCATA	AATTTTTAAC
ATACGAGGAG	CTGGATTAC	TCTTGCTCTT	TGCTCTTTAG	CTTAAAGTAT	TTAAAAATTG
5110	5120	5130	5140	5150	5160
AAAAAAATGA	CATCGTTTAT	TTACCTGGCC	GGAATCGCGA	GCGGAACCCA	AGCGGCTGTG
TTTTTTTACT	GTAGCAAATA	AATGGACCGG	CCTTAGCGCT	CGCCTTGGGT	TGCGCGACAC
5170	5180	5190	5200	5210	5220
GCATTTGCAC	AGCCTGCATT	CATTATCAAT	TGGTTTTTCT	GTTTACACTC	TCACTTAACA
CGTAAACGTG	TCGGACGTAA	GTAATAGTTA	ACCAAAAAAG	CAAATGTGAG	AGTGAATTGT
5230	5240	5250	5260	5270	5280
TAGCGAAAC	TTCAGGCACT	TCAATATATA	AAAACTGTTT	AATACAAGAT	GTATTTAAAC
ATCGCTTGTTG	AAGTCCGTGA	AGTTATATAT	TTTTGACAAA	TTATGTTCTA	CATAAAATTG
5290	5300	5310	5320	5330	5340
GTATAAAAAA	TTGATTTAAC	CTTAGGATTT	CGAAAACGCT	TGTTATAAAC	AAGATCTTTT
CATATTTTTT	AACTAAATTG	GAATCCTAAA	GCTTTGCGGA	ACAATATTTG	TTCTAGAAAA
5350	5360	5370	5380	5390	5400
CCGGAGAAAG	AATGAGCTTC	ATTAGAATGT	AACTGATCCC	GTTGCGGTATA	TAAACAAAAAT
GGCCTCTTTC	TACTCGAAG	TAATCTTACA	TGACTAGGG	CAACGCATAT	ATTTGTTTTA

```
      5410      5420      5430      5440      5450      5460
AATTCGAATG ATCAACAGAA ACAACGATGT TGAGTAATTC TGCTGAAACA AATACATCAT
TTAAGCTTAC TAGTTGTCTT TGTTGCTACA ACTCATTAAAG ACGACTTGTG TTATGTAGTA

      5470      5480      5490      5500      5510      5520
TTGTAAGCAA CATTTGAAGT GCGGACCAT T GAGTGGGCG TAAAAAACAT AAACAAATTA
AACATTGCTT GTAAACITCA CCGCTGGTAA ACTCACCCGC ATTTTTGTGA TTTGTTAAT

      5530      5540      5550      5560      5570      5580
GTGCTCGCCT TAGTTGTGAT CCACAATAAC ATGTCGTTTT CAGAAACACT AATTTTCGGA
CACGAGCGGA ATCAACACTA GGTGTTATTG TACAGCAAAA GTCTTTGTGA TAAAAAGCCT
```

ATTC
TAAG

Abb. 28: Nukleotidsequenz der cDNA-Fragmente zu Transkript VI

Unter den Restriktionskarten mit den zur Subklonierung benutzten Restriktionsschnittstellen sind Länge und Richtung der im einzelnen durchgeführten Sequenzierungsreaktionen durch Pfeile gekennzeichnet.

Restriktionsenzyme: E = Eco RI H = Hind III
 S = Sal I P = Pst I
 St = Stu I

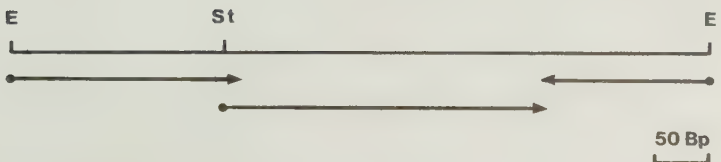
A: c1

B: c12

C: c18

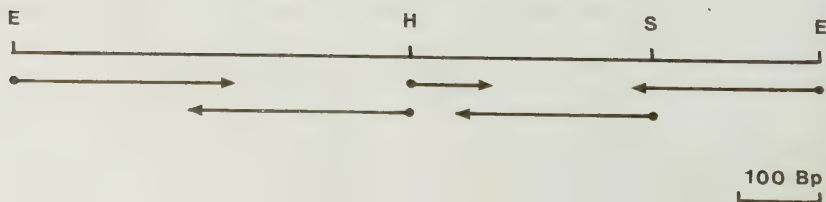
D: c113 (X bezeichnet eine poly(T)- bzw. poly(A)-Sequenz, deren Länge nicht genau bestimmt werden konnte)

A



10	20	30	40	50	60
GAATTCCTTGC	CGGCACCATC	CTTGGCCAGA	TGCGTTTCGA	AGAACTCCTC	GACAGTGTCT
CTTAAGAACG	GCCGTGGTAG	GAACCGGTCT	ACGCAAAAGCT	TCTTGAGGAG	CTGTCCACAGA
70	80	90	100	110	120
GTGTTCCACT	TGGTTATGGA	CAACGTCTCC	TGCACCTTTC	CACTGGGCATC	TAGGAGCTTT
CACAAGGTGA	ACCAATACCT	GTTGCAGAGG	ACGTGAAACG	GTGACCGTAG	ATCCTCGAAA
130	140	150	160	170	180
AACCAGCGGG	ATCCAGTCCT	CTTACGTATT	TGATCTGCAG	GTTGGGGAAC	TTGGCAGGTC
TTGGTCGCC	TAGGTCAGGA	GAATGCATAA	ACTAGACGTC	CAACCCCTTG	AACCGTCCAG
190	200	210	220	230	240
GGCGGCTTTG	AATAAAGGCC	TGAATCTGCG	GATAGGCCCG	GAATTTGCAG	GTGCACACTC
CCGGCGAAAC	TTATTTCCGG	ACTTAGACGC	CTATCCGGGC	CTTAAACGTC	CACGTGTGAG
250	260	270	280	290	300
AGAATTGCCT	TGGCATATGT	CCGCTGTGCC	GCCGGCTGCT	GATCCAAAAGT	GCAGCATTGC
TCTTAACGGA	ACCGTATACA	GGCGACACGG	CGGCCGACGA	CTAGGTTTCA	CGTCGTAACG
310	320	330	340	350	360
TTACACTGAG	GCTTGATGGT	ATCCAATCCG	AAATCATCCA	GTTTTTCGCA	ACTGGAACAC
AAATGTGACTC	CGAACTACCA	TAGGTTAGGC	TTTAGTAGGT	CAAAAAGCGT	TGACCTTGTG
370	380	390	400	410	420
ATTAAGTGGG	CCTTAATAAA	ACCCAACGCC	CGGCAGTCGG	CGGCCGTCAA	TTCGGCTTGA
TAAATTGACCC	GGAAATTATT	TGGGTTGCGG	GCCGTACGCC	GCCGGCAGTT	AAGCCGAACT
430	440	450	460	470	480
ATTTGCTGGC	AACTTAAAGC	CAGTAGAAGA	AATATAGTAA	ATTTGCTCTT	CAAGGAATCC
TAAACGACCG	TTGAATTTCG	GTCATCTTCT	TTATATCATT	TAAACGAGAA	GTTCCTTAGG
490	500	510	520	530	540
CTCCAGACGT	CCCGCGCTCC	ACACATGACG	TGCTTCGTGC	TTTAGTTTCA	GCACGCCCGA
GAGGTCTGCA	GGGCGCGAGG	TGTGTACTGC	ACGAAGCAGC	AAATCAAAGT	CGTGCGGGCT
550	560	570	580	590	600
TGTCAGCGTG	TAAATCAGTC	CCTCGTAGAA	GTTCTCCTCC	TTCCAGATTG	GCGGCCAACT
ACAGTCGCAC	ATTTAGTCAG	GGAGCATCTT	CAAGAGGAGG	AAGGTCTAAG	CGCCGGTTGA
610	620	630	640		
TGGCGCTGGC	CAACAGCGCC	GCCGGCAGAT	CGCAGCGGAA	TTC	
ACCGCGACCG	GTTGTCGCGG	CGGCCGTCTA	GCGTCGCCTT	AAG	

B

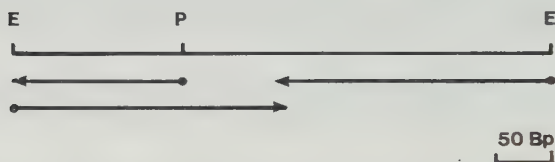


10	20	30	40	50	60
GAATTCCTGC	CGGCACCATC	CTTGCCAG	TGCGTTTCGA	AGAACTCCTC	GACAGTGTCT
CTTAAGAACG	GCCGTGGTAG	GAAACGGTCT	ACGCAAAAGCT	TCTTGAGGAG	CTGTCACAGA
70	80	90	100	110	120
GTGTTCCACT	TGGTTATGGA	CAACGTCTCC	TGCACTTTGC	CACTGGCATC	TAGGAGCTTT
CACAAGGTGA	ACCAATACCT	GTTGCAGAGG	ACGTGAAACG	GTGACCGTAG	ATCCTCGAAA
130	140	150	160	170	180
AACCAGCGGG	ATCCCATCAA	GCCTTTTTTT	TTTTTTTTTG	GTTTTATTTT	ATAAATATTT
TTGGTCGCC	TAGGGTAGTT	CGGAAAAAAA	AAAAAAAAC	CAAAATAAAA	TATTTATAAA
190	200	210	220	230	240
AGATAATATG	GCGTTGTTCA	TCATAGACTT	GCTTTAGAAT	CTCTTTAAAT	TCCAGGGGAT
TCTATTATAC	CGCAACAAGT	AGTATCTGAA	CGAAATCTTA	GAGAAATTTA	AGGTCCCCTA
250	260	270	280	290	300
AAGATGCGTC	GTCCATAACA	GCATCGTAAA	CATACTCTAA	ATTTGATTTG	GATTCATCTT
TTCTACGCAG	CAGGTATTGT	CGTAGCATTT	GTATGAGATT	TAAACTAAAC	CTAAGTAGAA
310	320	330	340	350	360
GAGGAGGAAG	TCTTGCCTCT	TCGGGATCAC	TCAACCCATT	TAAGTCTCCA	CAGGCTATAA
CTCCTCCTTC	AGAACGGAGA	AGCCCTAGTG	AGTTGGGTAA	ATTACAGAGT	GTCCGATATT
370	380	390	400	410	420
AAGGAACTAG	ACGACGGTTT	ACTTCCGACC	CTGTTTTCTG	TGCAGTAGCC	GTATATCATC
TTCTTTGATC	TGCTGCCAAA	TGAAGGCTGG	GACAAAAGAC	ACGTCATCGG	CATATAGTAG
430	440	450	460	470	480
GCGAGGAGGG	TTAATCGCTT	AGGAATGTAG	CCCTCGGAAG	GCAAAAATCG	GAGCAAACCA
CGCTCCTCCC	AATTAGCGAA	TCCTTACATC	GGGAGCCTTC	CGTTTTTAGC	CTCGTTTGGT
490	500	510	520	530	540
CAAAAGCTTC	AATGCTCGAA	GGACGCGAAC	TCGGTGGCTT	GTAGATGTGC	AATTTTTTGA
GTTTTCGAAG	TTACGAGCTT	CCTGCGCTTG	AGCCACCAGAA	CATCTACAGC	TTAAAAAACT
550	560	570	580	590	600
AAAAATATCTG	CATCTGGGAG	CTCAATAGCG	ATGTGGCATT	TCCCTTAAAA	ATCTTGGCCA
TTTTATAGAC	GTAGACCCCTC	GAGTTATCGC	TACACCGTAA	AGGGAATTTT	TAGAAACCGGT
610	620	630	640	650	660
CAAAATTTCC	GCCAGTTTCC	AGCACACAGG	TGGCAATGCT	GAGAGCAGCC	ACAAGTAACT
GTTTTAAAGG	CGGTCAAAGG	TCGTGTGTCC	ACCGTTACGA	CTCTCGTCGG	TGTTCAATTGA
670	680	690	700	710	720
GGTGCTGCAT	GTA CTGCTCC	ATTT CATGGA	CCCCGGTGAC	ATCGGGGGCT	CCATCGCAGA
CCACGACGTA	CATGAGCAGG	TAAAGTACCT	GGGGCCACTG	TAGCCCCCGA	GGTAGCGTCT
730	740	750	760	770	780
CCACCAGCTG	GGCTTTTTCA	TTTCCACCAA	AGTGACCGAT	GATTGCTTCG	GCGGTCGACT
GGTGGTCGAC	CCGAAAAAAGT	AAAGGTGGTT	TCACTGGCTA	CTAACGAAGC	CGCCAGCTGA
790	800	810	820	830	840
GCTTTGTGAT	ATCTCCCTGG	AGCTGGAGTA	TTCCACGGAT	CGGGCCATGG	CCTGCAGATC
CGAAACACTA	TAGAGGGGACC	TCGACCTCAT	AAGGTGCCTA	GCCCGGTACC	GGACGTCTAG
850	860	870	880	890	900
AACGGCTATG	ATCTTAACAG	CGGACTTTTC	ATCGTCCGTT	TCGCAGGTAT	CGTAGAGTTT
TTGCCGATAC	TAGAATTGTC	GCCTGAAAAAG	TAGCAGGCCAA	AGCGTCCATA	GCATCTCAAA

910 920 930 940 950 960
 CCGAGAGAGC ACCTGGGACC AGCTGCCAGG AGCAGCACAC AGATCGACTG CCCGCTGAAC
 GGCTCTCTCG TGGACCCCTGG TCGACGGTCC TCGTCGTGTG TCTAGCTGAC GGGCGGACTTG

 970
 ACCATTTAGA ATTG
 TGGTAAATCT TAAG

C



10 20 30 40 50 60
 GAAATTCCTTG CGGCACCATC CTTGGCCAGA TGCCTTTTCA AGAACTCCTC GACAGTGTCT
 CTTAAGAACG GCCGTGGTAG GAACCGGTCT ACGCAAAGCT TCTTGAGGAG CTGTACACAGA

 70 80 90 100 110 120
 GTGTTCCACT TGTTATGGA CAACGTCTCC TGCACTTTGC CACTGGCATC TAGGAGCTTT
 CACAAGGTGA ACCAATACCT GTTGACAGAG ACGTGAAACG GTGACCGTAG ATCCTCGAAA

 130 140 150 160 170 180
 AACCAGCGGG ATCCAGTCCT CTTACGTATT TGATCTGCAG GTTGGGGAAC TTGGCAGGTC
 TTGGTCGCCC TAGGTACAGGA GAATGCATAA ACTAGACGTC CAACCCCTTG AACCGTCCAG

 190 200 210 220 230 240
 GGCCGCTTTG AATAAAGGCC TGAATCTGCG GATAGGCCCG GAATTTGCAG GTGCACACTC
 CGGGCGAAAC TTATTTCGG ACTTAGACGC CTATCCGGGC CTAAACGTC CACGTGTGAG

 250 260 270 280 290 300
 AGAATTGCCT TGGCATATGT CCGCTGTGCC GCCGGCTGCT GATCCAAAGT GCAGCAATTGC
 TCTTAACGGA ACCGTATACA GGCACACGG CCGCCGACGA CTAGGTTTCA CGTCGTAACG

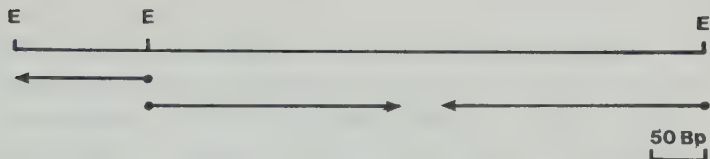
 310 320 330 340 350 360
 TTACACTGAG GCTTGATGGT ATCCAATCCG AAATCATCCA GTTTTTGCA ACTGGAACAC
 AATGTGACTC CGAACTACCA TAGGTTAGGC TTTAGTAGGT CAAAAAGCGT TGACCTTGTG

 370 380 390 400 410 420
 ATTAAGTGGG CCTTAATAAA ACCCAACGCC CGGCAGTCGG CGGCCGTCAA TTCGGCTTGA
 TAATTGACCC GGAATTATTT TGGGTTCGGC GCCGTCAGCC CGCGGCAGTT AAGCCGAAC

 430 440 450 460 470 480
 ATTTGCTGGC AACTTAAAGC CAGTAGAAGA AATATAGCAC ATTTATGCAT TTTTGTGGCT
 TAAACGACCG TTGAATTTG GTCATCTTCT TTATATCGTG TAAATACGTA AAAACACCGA

 490
 AAGCTGGAAT TC
 TTCGACCTTA AG

D



10	20	30	40	50	60
GAATTCXTAT	AGTTTTGTTT	CGGATTTTAT	TAATCTACAG	TTTTGGTATG	CTTATTTTATG
CTTAAGXATA	TCAAAACAAA	GCCTAAAAATA	ATTAGATGTC	AAACCATAC	GAATAAAATC
70	80	90	100	110	120
ATCCTGTITG	TTCGCAGGTA	ATCTTCATCG	TCATCTCCAT	CGGCATCCTC	CACCACGCTG
TAGGACAACC	AAGCGTCCAT	TAGAAGTAGC	AGTAGAGGTA	GCCGTAGGAG	GTGGTGCAGC
130	140	150	160	170	180
TACGAATTCT	TGCCGGCACC	ATCCTTGGCC	AGATGCGTTT	CGAAGAACTC	CTCGACAGTG
ATGCTTAAGA	ACGGCCGTGG	TAGGAACCGG	TCTACGCAAA	GCTTCTTGAG	GAGCTGTCCAC
190	200	210	220	230	240
TCTGTGTTCC	ACTTGTTTAT	GGACAACGTC	TCCTGCACCT	TGCCACTGGC	ATCTAGGAGC
AGACACAAGG	TGAACCAATA	CCTGTTGCAG	AGGACGTGAA	ACGGTGACCG	TAGATCCTCG
250	260	270	280	290	300
TTTAACGAGC	GGGATCCAGT	CCTCTTACGT	ATTGATCTG	CAGGTGGGGG	AACTTGGCAG
AAATTGGTCG	CCCTAGGTCA	GGAGAATGCA	TAAACTAGAC	GTCCAACCCC	TTGAACCGTC
310	320	330	340	350	360
GTCGGCCGCT	TTGAATAAAG	GCCTGAATCT	GCGGATAGGC	CCGGAATTTG	CAGGTGCACA
CAGCCGGCGA	AACTTATTTT	CGGACTTAGA	CGCCTATCCG	GGCCTTAAAC	GTCCACGTGT
370	380	390	400	410	420
CTCAGAATTG	CCTTGGCATA	TGTCCGCTGT	GCCGCCGGCT	GCTGATCCAA	AGTGCAGCAT
GAGTCTTAAC	GGAACCGTAT	ACAGGCGACA	CGGCGGCCGA	CGACTAGGTT	TCACGTCGTA
430	440	450	460	470	480
TGCTTACACT	GAGGCTTGAT	GGTATCCAAT	CCGAAATCAT	CCAGTTTTTC	GCAACTGGAA
ACGAATGTGA	CTCCGAACTA	CCATAGGTTA	GGCTTTAGTA	GGTCAAAAAG	CGTTGACCTT
490	500	510	520	530	540
CACATTAACT	GGGCCTTAAT	AAAACCCAAC	GCCCGGCAGT	CGGCGGCCGT	CAATTCCGCT
GTGTAATTGA	CCCGGAATTA	TTTTGGGTTG	CGGGCCGTCA	GCCGCCGGCA	GTTAAGCCGA
550	560	570	580	590	600
TGAATTTGCT	GGCAACTTAA	AGCCAGTAGA	AGAAATATAG	CACATTTATG	CATTTTTGTG
ACTTAAACGA	CCGTTGAATT	TCGGTCATCT	TCTTTATATC	GTGTAATAAC	GTAAAAACAC
610	620	630			
GCTAATTCTA	ATTAATTTTA	CTACGTCCAC	GGALTTT		
CGATTAAGAT	TAATTTAAAT	GATGCAGGTG	CCTTAAG		

Die Klonierung der beiden kleinen Eco RI-Eco RI-Fragmente von c113 und c157 in einen M13-Vektor gelang nicht. Deshalb wurden das ca. 350 Bp-Eco RI-Eco RI-Fragment von c113 in pAT153 und das ca. 300 Bp-Eco RI-Eco RI-Fragment von c157 in Bluescript M13+KS kloniert und, wie in 2.9.2. beschrieben, sequenziert. Es stellte sich heraus, daß beide Fragmente eine identische DNA-Sequenz haben und sich nur in der Länge der poly(A)-Enden unterscheiden. Das ca. 0,5 kBp-Eco RI-Eco RI-Fragment von c157 wurde nicht sequenziert.

3.3.3. Auswertung der Sequenzdaten

Der Vergleich der cDNA-Sequenzen mit der genomischen DNA führte zu folgenden Ergebnissen:

- a) c1 ist von Base 1 bis 457 identisch mit der genomischen Sequenz von Base 649 bis 960, 1278 bis 1396 bzw. 1452 bis 1477. Die genomische DNA enthält zwei intervenierende Sequenzen mit einer Länge von 317 Bp (961 bis 1277, Intron 2) und 55 Bp (1397 bis 1451, Intron 1). Die restlichen 186 Bp von c1 fehlen in der sequenzierten genomischen DNA.
- b) c12 ist von Base 1 bis 134 identisch mit der genomischen Sequenz von Base 649 bis 782. Die restlichen 840 Bp von c12 sind in der sequenzierten genomischen DNA nicht enthalten.
- c) c18 ist von Base 1 bis 482 identisch mit der genomischen Sequenz von Base 649 bis 960, 1278 bis 1396 bzw. 1452 bis 1502. Die beiden intervenierenden Sequenzen stimmen mit den unter a) beschriebenen überein. Die restlichen 10 Bp von c18 bestehen aus der bei der Konstruktion der cDNA-Bibliothek eingefügten Eco RI-Erkennungssequenz sowie aus vier zusätzlichen Basenpaaren, die der genomischen DNA nicht zugeordnet werden können.
- d) c113 ist identisch mit der genomischen Sequenz von Base 533 bis 960, 1278 bis 1396 bzw. 1452 bis 1528, ebenfalls ohne die beiden in a) dargestellten intervenierenden Sequenzen. Vor der in Abb. 28D gezeigten cDNA-Sequenz liegt

ein poly(T)-Bereich (mit X bezeichnet), dessen Länge nicht genau bestimmt werden konnte. An beiden Enden des Fragments befinden sich die bei der cDNA-Klonierung eingefügten Eco RI-Erkennungssequenzen. Die mit c13 übereinstimmende genomische DNA ist in Abb. 27 durch Unterstreichen hervorgehoben.

Die cDNA-Klone c1 und c12 enthalten Sequenzen, die in den sequenzierten 5,6 kBp der genomischen DNA nicht auftreten. Außerhalb dieses Bereichs findet keine Hybridisierung der Klone an genomische DNA aus 74F statt. Daraus folgt, daß die unbekannten Sequenzen vermutlich aus einem anderen Genort stammen. Zur Absicherung dieser Schlußfolgerung wurde radioaktiv markierte DNA von c1, c12 und c18 an restringierte und immobilisierte gesamtgenomische DNA aus Adulten, freundlicherweise von A. Baumann zur Verfügung gestellt, hybridisiert (s. 2.2.4. und 2.7.1.) (Abb. 29). Neben dem erwarteten Hybridisierungssignal aller drei cDNA-Klone in Höhe von 2,8 kBp (bei c12 äußerst schwach) (s. Abb. 23, Eco RI-Verdauung) tritt bei der Hybridisierung mit c1 und c12 jeweils ein zusätzliches Signal bei ca. 1,6 kBp bzw. 1,5 kBp auf, das aus dem Restriktionsmuster der 74F-DNA nicht erklärt werden kann. Mit Ausnahme der ersten 134 Bp haben die Klone c1 und c12 untereinander keine Homologien. Beim Übergang von genomisch lokalisierter zu nicht lokalisierter Sequenz sind in beiden Fällen keine Spleißstellen vorhanden. In c12 folgt ein Bereich aus 16 T- bzw. A-Resten. Unmittelbar davor, 5'-aufwärts, befindet sich auf dem unteren Strang ein Polyadenylierungssignal (AATAAA, Nukleotid 163 bis 168; Proudfoot, 1984). In der nicht lokalisierten Sequenz von c1 liegt in beiden Richtungen ein durchgehender offener Leserahmen vor, der sich jedoch nicht in der lokalisierten Sequenz fortsetzt. Bei c12 sind in beiden Richtungen mehrere kürzere offene Leserahmen (maximal codierend für 76 Aminosäuren) vorhanden. Die Hybridisierung von c12 an immobilisierte Speicheldrüsen-RNA (s. 3.2.3.) zeigt ein zweites Transkript, das keinem der in 74F identifizierten Transkripte entspricht.

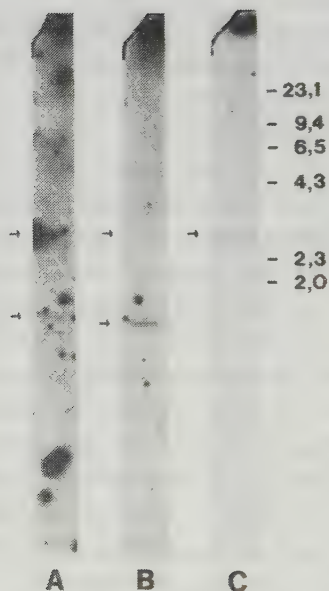


Abb. 29: Autoradiogramm der Hybridisierung radioaktiv markierter c1-, c12- und c18-DNA an immobilisierte gesamtgenomische DNA von D. melanogaster

Gesamtgenomische DNA aus jeweils 2,5 Fliegen wurde mit Eco RI restringiert, auf einem 0,7 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembran transferiert (s. 2.2.4.). Nach der Hybridisierung (24 Stunden bei 42°C) erfolgten Waschen der Membran und Autoradiografie (Belichtungszeit: 7 Tage), wie in 2.7.1. beschrieben.

A: Hybridisierung mit "nick-translatiertem" c1-Fragment: spez. Akt.: 2×10^8 cpm/ μ g; $6,7 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung

B: Hybridisierung mit "nick-translatiertem" c12-Fragment: spez. Akt.: $2,4 \times 10^8$ cpm/ μ g; 8×10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung

C: Hybridisierung mit "nick-translatiertem" c18-Fragment: spez. Akt.: 1×10^8 cpm/ μ g; $3,3 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung

Durch Vergleich der genomischen DNA mit den cDNA-Fragmenten c1, c18 und c113 wurden zwei Introns nachgewiesen, die in der reifen mRNA von Transkript VI und somit auch in der davon abbeschriebenen cDNA fehlen. Die jeweiligen 5'-Spleißstellen (AGT↓GTAAGT bei Intron 1, Position 1451 bis 1397 und CAA↓GTGGGT bei Intron 2, Position 1277 bis 961 in Abb. 27, unterer Strang) stimmen größtenteils mit der aus Sequenzdaten vieler eukaryotischer Gene abgeleiteten Consensussequenz (A/C)AG↓GT(A/G)AGT überein, bei der die Nukleotide GT essentiell sind (Cech, 1983). Auch die 3'-Spleißstellen (CAG↓ bei beiden Introns) entsprechen der Consensussequenz (C/T)AG (Snyder et al., 1982). Keller und Noon haben durch Vergleich vieler Drosophila-Gene konservierte Sequenzelemente im 3'-Bereich von Introns ermittelt, die beim Spleißvorgang zur Ausbildung der intermediären "Lasso"-Struktur erforderlich sind und den Verzweigungspunkt des "Lassos" definieren (Keller und Noon, 1985). Diese Elemente haben die Consensussequenz (C/T)T(A/G)A(T/C). Sie sind in abgewandelter Form auch in anderen Eukaryoten, z.B. Pilzen, Pflanzen und Säugern, vorhanden. In Drosophila liegt diese Sequenz 18 bis 35 Nukleotide vor der 3'-Spleißstelle. Die dazwischen liegende Sequenz ist pyrimidinreich und das Dinukleotid AG kommt nicht vor. Beide Introns von Transkript VI erfüllen alle genannten Kriterien. Bei Intron 1 entspricht die Sequenz TTAAT (Position 1421 bis 1417, Abb. 27, unterer Strang) dem Consensus. Bei Intron 2 stimmt die Sequenz TTCAT (Position 989 bis 985, Abb. 27, unterer Strang) nicht genau mit der Consensussequenz überein. Diese Basenzusammensetzung ist aber bereits in intervenierenden Sequenzen anderer Drosophila-Gene gefunden worden (Keller und Noon, 1985). Beide Introns sind mit 73 % und 72 % sehr A+T-reich. Dies ist auch bei einigen anderen intervenierenden Sequenzen von Drosophila der Fall (O'Connell und Rosbash, 1984).

c113, der längste cDNA-Klon, dessen Sequenz in der genomischen DNA von 74F lokalisiert werden konnte, weist entsprechend der ermittelten Transkriptionsrichtung von VI (s. 3.1.6.) mehrere kurze offene Leserahmen auf. In ihnen kommt

Abb. 30: Nukleotidsequenz und - entsprechend der Transkriptionsrichtung - daraus abgeleitete Aminosäuresequenz von c113

Die Basennummerierung in dieser Abbildung ist eine Umkehrung der in Abb. 29 dargestellten.

10	20	30	40	50	60
GAATTCGGTGGACGTAGTAAATTTAATTAGAAATTAGCCACAAAAATGCATAAATGTGCTA					
MetHisLysCysAlaI					
70	80	90	100	110	120
TATTTCTTCTACTGGCTTTAAGTTGCCAGCAAATTCAGCCGAATTGACGGCCGCCGACT					
lePheLeuLeuLeuAlaLeuSerCysGlnGlnIleGlnAlaGluLeuThrAlaAlaAspC					
130	140	150	160	170	180
GCCGGGCGTGGGTTTTATTAAGGCCAGTTAATGTGTTCCAGTTGCGAAAACTGGATG					
ysArgAlaLeuGlyPheIleLysAlaGlnLeuMetCysSerSerCysGluLysLeuAspA					
190	200	210	220	230	240
ATTCGGGATTGGATACCATCAAGCCTCAGTGTAAAGCAATGCTGCACTTTGGATCAGCAGC					
spPheGlyLeuAspThrIleLysProGlnCysLysGlnCysCysThrLeuAspGlnGlnP					
250	260	270	280	290	300
CGGCGGCACAGCGGACATATGCCAAGGCAATTCAGTGTGCACCTGCAAATTCGGGGCC					
roAlaAlaGlnArgThrTyrAlaLysAlaIleLeuSerValHisLeuGlnIleProGlyL					
310	320	330	340	350	360
TATCCGCAGATTGAGGCTTTATTCAAAGCGGCGGACCTGCCAAGTTCCCCAACCTGCAG					
euSerAlaAspSerGlyLeuTyrSerLysArgProThrCysGlnValProGlnProAlaA					
370	380	390	400	410	420
ATCAAATACGTAAGAGGACTGGATCCCGCTGGTTAAAGCTCCTAGATGCCAGTGGCAAAG					
spGlnIleArgLysArgThrGlySerArgTrpLeuLysLeuLeuAspAlaSerGlyLysV					
430	440	450	460	470	480
TGCAGGAGACGTTGTCCATAACCAAGTGAACACAGACACTGTCGAGGAGTTCTTCGAAA					
alGlnGluThrLeuSerIleThrLysTrpAsnThrAspThrValGluGluPhePheGluT					
490	500	510	520	530	540
CGCATCTGGCCAAAGGATGGTGCCGGCAAGAATTCGTACAGCGTGGTGGAGGATGCCGATG					
hrHisLeuAlaLysAspGlyAlaGlyLysAsnSerTyrSerValValGluAspAlaAspG					
550	560	570	580	590	600
GAGATGACGATGAAGATTACCTGCGAACCAACAGGATCTAAAAATAAGCATACCAAACTG					
lyAspAspAspGluAspTyrLeuArgThrAsnArgIle					
610	620	630			
TAGATTAATAAAATCCGAAACAAAACCTATATXGAATTC					

Tab. 2:

AS	Codon	Drosophila	c113	AS	Codon	Drosophila	c113
Phe	TTT	0,175	2	Ala	GCC	0,629	9
	TTC	0,825	3		GCA	0,083	4
Leu	TTA	0,018	3		GCG	0,077	2
	TTG	0,110	5	Tyr	TAT	0,190	2
	CTT	0,077	2		TAC	0,810	2
	CTC	0,160	1	His	CAT	0,307	2
	CTA	0,041	3		CAC	0,693	1
Ile	CTG	0,595	6	Gln	CAA	0,148	7
	ATT	0,256	4		CAG	0,852	7
	ATC	0,723	2	Asn	AAT	0,179	1
	ATA	0,020	3		AAC	0,821	2
Met	ATG	1,000	2	Lys	AAA	0,116	2
Val	GTT	0,155	1		AAG	0,884	10
	GTC	0,378	1	Asp	GAT	0,477	13
	GTA	0,034	0		GAC	0,523	3
	GTG	0,432	4	Glu	GAA	0,112	4
	TCT	0,070	0		GAG	0,888	4
Ser	TCC	0,345	4	Cys	TGT	0,317	3
	TCA	0,050	2		TGC	0,683	6
	TCG	0,206	1	Trp	TGG	1,000	2
	AGT	0,050	5		CGT	0,250	1
	AGC	0,278	1		CGC	0,468	1
Pro	CCT	0,162	2		CGA	0,075	1
	CCC	0,543	1		CGG	0,075	3
	CCA	0,159	0		AGA	0,045	0
	CCG	0,136	3		AGG	0,087	2
Thr	ACT	0,144	3	Gly	GGT	0,283	2
	ACC	0,642	4		GGC	0,387	4
	ACA	0,073	2		GGA	0,317	3
	ACG	0,141	3		GGG	0,013	0
Ala	GCT	0,211	2				

AS : Aminosäure

Drosophila: gemittelte Frequenz des Codon-Gebrauchs aus 25
Drosophila-Genen (Cherbas et al., 1986)

c113 : Codons des aus der Sequenz von c113 abgeleiteten
Polypeptids

entweder kein Initiationscodon (ATG) vor, oder es stimmt die das ATG-Codon umgebenden Sequenz nicht mit der für *Drosophila*-Gene ermittelten Consensussequenz des Translationsstarts (ANN(C/A)A(C/A)(C/A)ATGNNN, Regulski et al., 1987) überein. Es ist lediglich ein langer offener Leserahmen vorhanden (s. Abb. 30). Ein mögliches Initiationscodon wird durch die Basen 45 bis 47 (Numerierung der Nukleotide aus Abb. 30) repräsentiert. Die Sequenz von Position 38 bis 50 stimmt mit der Consensussequenz des Translationsstarts überein (CACAAAAATGCAT). 19 bis 21 Nukleotide 5'-aufwärts liegt in diesem Leserahmen ein Stop-Codon. Der Leserahmen von c113 endet bei Base 578 und codiert für 178 Aminosäuren eines Polypeptids mit einem Molekulargewicht von 19,7 kD. In Position 607 bis 612 befindet sich ein Polyadenylierungssignal (AATAAA; Proudfoot, 1984). 19 Nukleotide 3'-abwärts beginnt die poly(A)-Sequenz von Transkript VI. Die 178 Aminosäuren des Polypeptids bestehen zu 27 % aus hydrophoben (Phe, Trp, Tyr, Ile, Leu, Met, Val), zu 11,8 % aus basischen (Arg, Lys) und zu 13,5 % aus sauren (Asp, Glu) Resten. Der Codongebrauch für die einzelnen Aminosäuren stimmt größtenteils mit der aus *Drosophila*-Genen abgeleiteten Codonpräferenz überein (s. Tab. 2; Cherbas et al., 1986).

4. Diskussion

Gegen Ende des 3. Larvenstadiums tritt in polytänen Chromosomen von Drosophila melanogaster eine ecdysteroidinduzierte Puffabfolge auf. Das von Ashburner et al. aufgestellte Modell zur Regulation des Puffzyklus durch Ecdysteroidhormone beruht auf in vivo-Beobachtungen der Puffabfolge von Speicheldrüsenchromosomen und auf in vitro-Experimenten. In diesen wurden sowohl der Einfluß von β -Ecdyson auf das Puffmuster kultivierter Speicheldrüsen als auch die Wirkung von Inhibitoren der Proteinbiosynthese und des Hormonentzugs zu bestimmten Zeitpunkten innerhalb des Zyklus untersucht (Ashburner et al., 1974). Durch Experimente, in denen die sequenzielle Bindung von Ecdysteroiden an gepuffte Loci direkt nachgewiesen wurde, konnte das Modell modifiziert werden (Gronemeyer und Pongs, 1980; Dworniczak et al., 1983). Vereinfacht besagt es, daß das Steroidhormon zusammen mit einem Rezeptorprotein direkt auf die Loci der frühen Puffs einwirkt. Die Puffausbildung und somit auch die Transkription von Genen dieser Loci werden induziert. Die Genprodukte früher Puffs verursachen gemeinsam mit dem Ecdysteroid-Rezeptor-Komplex die Aktivierung der späten und die Regression der frühen Puffs.

Das Modell bietet eine allgemeine Arbeitsgrundlage für Untersuchungen zur Genregulation. Es läßt jedoch viele Fragen offen, die nur auf molekularer Ebene geklärt werden können. Dazu gehören die biochemischen Ursachen der Puffausbildung und -regression sowie die individuelle Regulation der einzelnen Puffs. Nicht alle Puffs einer Gruppe reagieren bei Anstieg des Hormontiters bzw. bei Hormonentzug gleich. Während beispielsweise die Regression der Zwischenhäutungspuffs 25AC und 68C in vitro durch β -Ecdyson stark beschleunigt wird, scheint die Regression von 3C11 hormonunabhängig zu sein (Ashburner, 1973). Einige Puffs werden sowohl in larvalen als auch in präpupalen Speicheldrüsenchromosomen unter Einfluß von β -Ecdyson induziert (z.B. 62E, 74EF, 75B), andere dagegen nur in Larven (z.B. 78D) oder nur in Vorpuppen (z.B. 93F) (Richards, 1976). Ein Teil der in larvalen Speicheldrü-

senchrosomen beobachteten Puffs tritt auch in Fettkörperchromosomen auf. Dabei unterscheidet sich der zeitliche Verlauf der Aktivität dieser Puffs von dem bei Speicheldrüsen festgestellten (z.B. 74EF, 75B) (Richards, 1982).

Aus diesen Erkenntnissen ergeben sich u.a. folgende Fragen:

- Wie viele Gene sind innerhalb eines Puffs codiert?
- Werden diese Gene gemeinsam oder unabhängig voneinander reguliert?
- Welche Gene stehen unter direkter Hormonkontrolle?
- Werden dieselben Gene exprimiert, wenn ein Puff sowohl in larvalen als auch in präpupalen Speicheldrüsenchromosomen induziert wird?
- Werden in verschiedenen Geweben (z.B. Speicheldrüsen und Fettkörper) dieselben Gene eines Puffs exprimiert?
- Welche Faktoren (Genprodukte aus frühen Puffs) kontrollieren zusammen mit dem Ecdysteroid-Rezeptor-Komplex den Ablauf des Puffzyklus in den verschiedenen Geweben der Larven und Vorpuppen?
- Haben die Genprodukte eines Puffs möglicherweise verwandte Funktionen? (Beispiele für Genkluster liegen u.a. bei den Kutikulagenen (44D; Snyder et al., 1982), bei Genen für speicheldrüsenspezifische Sekretionsproteine (68C; Meyero-witz und Hogness, 1982) und den Hitzeschockgenen (67B; Corces et al., 1980) vor.)
- Werden auch in anderen Entwicklungsabschnitten die Genprodukte der im 3. Häutungsstadium und im Vorpuppenstadium dekontensierten Loci benötigt?

Zur Klärung einiger dieser Fragen wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Transkriptanalyse von DNA aus dem frühen ecdysteroidinduzierten Puff 74EF begonnen. Die Arbeit befaßt sich mit dem proximalen Bereich der bis jetzt klonierten DNA. Der distale Bereich wurde zunächst von H.-J. Lüdecke und später von G. Feigl teilweise analysiert (Lüdecke, 1985; Feigl, persönliche Mitteilung).

Die zur Transkriptanalyse eingesetzte RNA wurde aus in vitro mit β -Ecdyson inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern isoliert. Die gewählte Hormonkonzentration von 5×10^{-6} M liegt

im Sättigungsbereich der Dosis-Antwort-Kurve für diesen Puff und gewährleistet eine maximale Puffinduktion bei vierstündiger Inkubation (Ashburner, 1973). Bei einigen Experimenten wurde Cycloheximid mit einer Konzentration von 7×10^{-4} M zugefügt, da Ashburner gezeigt hatte, daß diese Konzentration zur quantitativen Hemmung der Proteinbiosynthese ausreicht (Ashburner, 1974).

Unversehrtheit und Transfereffizienz der RNA auf Nylonmembranen wurden bei jeder isolierten RNA durch Kontrollhybridisierungen mit β -Tubulin-DNA (pTu56) überprüft. Dabei stellte sich heraus, daß bei gleichbleibender Menge der aufgetrennten RNA das Hybridisierungssignal von pTu56-DNA an Fettkörper-RNA schwächer war als an Speicheldrüsen-RNA. Die mRNA-Konzentration von β -Tubulin in Fettkörpern ist demnach wahrscheinlich geringer als in Speicheldrüsen. Die Inkubation des Gewebes mit β -Ecdyson und Cycloheximid führte zu einer Stabilisierung der Tubulin-mRNA. Diese Ergebnisse stimmen mit entsprechenden Beobachtungen von Lüdecke, Gram und Feigl überein (Lüdecke, 1985; Gram, 1986; Feigl, 1986). Die nachgewiesene relative Häufigkeit von Tubulin-mRNA in stadienspezifischer RNA von *Drosophila* entspricht der in der Literatur beschriebenen (Biolajan et al., 1984).

Die präparationsbedingte Kontamination der Speicheldrüsen-RNA mit größeren Mengen Fettkörper-RNA konnte durch die Hybridisierung mit einem cDNA-Klon des Gens LSP1 λ ausgeschlossen werden. Neben dem fettkörperspezifischen Hybridisierungssignal von LSP1 λ trat noch ein weiteres, schwächeres Signal sowohl mit Speicheldrüsen- als auch mit Fettkörper-RNA auf. Dieses ist wahrscheinlich auf eine Kreuzhybridisierung mit dem noch nicht identifizierten Transkript eines anderen Genorts zurückzuführen. Der benutzte cDNA-Klon hybridisiert in situ nicht nur an 61A (LSP1 λ), sondern auch an mehrere andere Loci (Koerwer, 1983; Hirschberg, 1984).

In einem weiteren Kontrollexperiment wurde DNA eines Hitzeschockgens (hsp 70) an RNA aus inkubierten Speicheldrüsen hybridisiert. Der Nachweis größerer Mengen Hitzeschock-RNA in inkubiertem Gewebe würde den verwendeten Ansatz der Transkriptanalyse in Frage stellen. Hitzeschockproteine würden

auf eine durch die in vitro-Bedingungen des Experiments hervorgerufene Veränderung des Gewebes hinweisen. Somit wären die daraus gewonnen Aussagen über Zu- oder Abnahme der Transkriptmenge einzelner Gene verfälscht. In PS1-Speicheldrüsen ("0 Stunden"-Inkubationen) konnte hsp 70-mRNA nicht nachgewiesen werden, in 1 bis 8 Stunden inkubiertem Gewebe nur in sehr geringer Menge. Aufgrund der deutlichen sprunghaften Zunahme von hsp 70-mRNA bei zehnstündigen Inkubationen wurden im folgenden bei der Interpretation Daten derart langzeitiger Experimente aus oben genannten Gründen nicht mehr berücksichtigt. In keinem Fall wurden bei den nach Inkubation angefertigten Kontroll-Quetschpräparaten Hitzeschock-Puffs beobachtet.

Um einen Überblick über die in der untersuchten DNA codierten und in Speicheldrüsen bzw. Fettkörpern des 3. Häutungsstadiums synthetisierten Transkripte zu bekommen, wurde zunächst die DNA der vier λ -Klone mit insertierter genomischer DNA, die die Region abdecken, an RNA aus inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern hybridisiert. Anschließend wurde versucht, durch Hybridisierung mit einzelnen Subklonen oder Restriktionsfragmenten der λ -Phagen den für ein bestimmtes Transkript codierenden Bereich näher einzugrenzen. Mit diesem experimentellen Ansatz, bei dem wegen der geringen verfügbaren RNA-Menge Gesamt-RNA eingesetzt wurde, können jedoch nur relativ häufige Transkripte nachgewiesen werden. Es ist daher nicht auszuschließen, daß seltene Transkripte unentdeckt bleiben. Ebenso ist es möglich, daß Transkripte zwar in 74F codiert sind, aber in anderen Entwicklungsstadien als dem 3. Häutungsstadium synthetisiert werden. An dieser Stelle sei auch auf Experimente von Zhimulev et al. zur Proteinsynthese in Speicheldrüsen hingewiesen, bei denen sowohl Speicheldrüsen aus Larven und Vorpuppen als auch über verschieden lange Zeiträume mit und ohne β -Ecdyson in vitro-inkubierte "PS1"-Speicheldrüsen untersucht wurden (Zhimulev et al., 1981). Dabei hatte sich herausgestellt, daß die Synthese einiger Proteine in vivo von PS 1 bis zum Ende des Vorpuppenstadiums zu- bzw. abnimmt. Diese Entwicklung läßt sich in vitro nur teilweise nachvollziehen. Einige Proteine

werden ausschließlich in vitro, unabhängig von der Gegenwart des Hormons neu synthetisiert, andere nur in vitro und nur in Abwesenheit von β -Ecdyson. Es ist daher wesentlich, aus in vitro-Experimenten abgeleitete Ergebnisse auch in vivo bestätigen zu können.

Insgesamt wurden in 74F acht Transkripte nachgewiesen, von denen vier in beiden untersuchten Geweben synthetisiert werden. Die Inkubation mit β -Ecdyson ist ohne Einfluß auf die jeweilige Transkriptmenge. Drei der Transkripte, II, III und IV, stammen aus dem Phagen λ MOT 4. Sie wurden bereits von Möritz nachgewiesen und teilweise charakterisiert (Möritz, 1985). Auffällig bei der Hybridisierung mit λ MOT 4-DNA ist die insgesamt geringe Intensität der Signale, im Vergleich zu der bei Möritz gezeigten. Sie kann nicht auf einen unzureichenden Transfer der RNA auf die Nylonmembran zurückgeführt werden, da die anschließende Kontrollhybridisierung mit Tubulin-DNA an diese immobilisierte RNA zu Hybridisierungssignalen üblicher Stärke führte. Die geringe Signalintensität kann Ursache dafür sein, daß ein relativ seltenes 0,9 kB-Transkript, von Möritz mit Subklonen genomischer DNA (pSC12 und pSC15; Möritz, 1985) und von Feigl mit einem zu der Region homologen cDNA-Klon (Feigl, 1986) nachgewiesen, hier nicht gefunden wurde. Das vierte der erwähnten Transkripte, VIII, stammt aus der insertierten DNA des Phagen λ MOT 13. Die dazu isolierten cDNA-Klone hybridisieren zusätzlich an RNA des Transkripts VII, das hormonunabhängig nur in Speicheldrüsen synthetisiert wird. Eine genaue genomische Lokalisation der transkribierten Bereiche ist noch nicht durchgeführt worden. Auch ein möglicher Zusammenhang zwischen VII und VIII (z.B. alternatives Spleißen, unterschiedliche Start- und Endpunkte der Transkription oder aber Transkription der beiden komplementären DNA-Stränge) ist bislang ungeklärt. Das Hybridisierungssignal von VII liegt nicht in Form einer distinkten Bande vor, sondern erstreckt sich über einen großen Bereich der Gelbahn. Wie die anschließende Hybridisierung mit Tubulin-DNA gezeigt hat, war die immobilisierte RNA nicht degradiert. Die "Form" des Signals konnte mit einem cDNA-Klon reproduziert werden. Folglich besteht die Möglich-

keit, daß die mRNA von VII einem schnellen Umsatz in Speicheldrüsen unterliegt und bei Hybridisierungen auch Zwischenprodukte des Transkriptionsprozesses und des Abbaus der mRNA nachgewiesen werden. Neben VII ist in der untersuchten DNA ein weiteres, gewebespezifisches und hormonunabhängiges Transkript, V, codiert. Es tritt relativ häufig ausschließlich in Fettkörpergewebe auf und stammt aus der insertierten DNA des Phagen λ MOT 13.

Lediglich an zwei überwiegend in Speicheldrüsen vorkommenden Transkripten (I, VI) konnte eine Veränderung der Transkriptmenge bei Inkubation des Gewebes festgestellt werden.

I (aus λ MOT 6) zeigt eine ca. fünffache Zunahme der Transkriptmenge mit einem Maximum bei vierstündiger Inkubation, die allerdings auch in Abwesenheit von β -Ecdyson stattfindet. Daraus folgt, daß die Expression von I nicht unter direkter Hormonkontrolle steht, sondern auf bisher unbekannte Art und Weise reguliert wird. Dieses Ergebnis wurde durch den Nachweis von I in Larven der temperatursensitiven Mutante 1(3)ecdysone-1^{ts} bestätigt, bei der der Ecdysteroidtiter bei nicht-permissiver Temperatur nur 5 % des Wildtypwerts beträgt (Garen et al., 1977). Experimente mit diesem Stamm sind allerdings vorsichtig zu interpretieren, da der primäre Defekt der Mutante noch nicht geklärt ist und die Hormondefizienz sekundäre Folge des Absterbens von Zellgruppen bzw. gehemmten Gewebewachstums sein kann (Redfern und Bownes, 1983). Auch in RNA aus Larven mit einer Mutation im frühen ecdysteroidinduzierten Puff 2B5, dessen Genprodukte u.a. die Induktion der Puffs 74EF und 75B beeinflussen (Belyaeva et al., 1981), ist Transkript I nachweisbar. Demnach scheint es nicht an der Regulation des Puffzyklus beteiligt zu sein. In geringer Konzentration ist I auch in Fettkörpern vorhanden. In diesem Gewebe nimmt die Transkriptmenge nicht zu. In sämtlichen untersuchten Entwicklungsstadien wird I exprimiert und folgt dabei nicht dem Ecdysteroidtiter. Es ist vielmehr in fast allen Stadien, relativ zur Tubulin-mRNA, mit vergleichbarer Häufigkeit vertreten. Nur in Larven des späten 3. Häutungsstadiums, d.h. kurz vor der Verpuppung, ist eine Verringerung der Transkriptmenge und in Adulten eine Zunahme

festzustellen. Durch Einsatz in vitro-transkribierter, radioaktiv markierter RNA eines Subklons von λ MOT 6 wurde die Transkriptionsrichtung bestimmt. Die Isolierung mehrerer cDNA-Klone zu I wird eine spätere genauere Charakterisierung des Gens und des Genprodukts ermöglichen, bei der die Fragen der gewebespezifischen Regulation geklärt werden können.

Das andere Transkript, VI, dessen Menge in in vitro-inkubierten Speicheldrüsen abnimmt, ist in der insertierten DNA des Phagen λ MOT 13 codiert. Die Abnahme der Transkriptmenge erfolgt schnell und hormonunabhängig. Nach einstündiger Inkubation ist nur noch ein Drittel, nach dreistündiger nur noch ein Fünftel der Ausgangsmenge nachweisbar. Auch in Fettkörpergewebe ist VI in sehr geringer Konzentration vorhanden. Eine präparationsbedingte Kontamination von Fettkörper- mit Speicheldrüsen-RNA ist auszuschließen, weil in einem Kontrollexperiment mit einem häufigen speicheldrüsen-spezifischen Transkript (sgs 4) gezeigt wurde, daß die isolierte Fettkörper-RNA frei von Speicheldrüsen-RNA ist. Außerdem bleibt die Transkriptmenge von VI in inkubierten Fettkörpern im Gegensatz zu Speicheldrüsen konstant. Es liegt also ein Transkript I vergleichbarer Fall unterschiedlicher gewebespezifischer Regulation der Genexpression vor. Auch dieses Transkript ist sowohl in RNA aus Larven des Stamms l(3)ecdysone-1^{ts} als auch des Stamms l(1)t435 vorhanden. Es scheint - ebenso wie die anderen nachgewiesenen Transkripte - nicht an der direkten hormonkontrollierten Regulation des Puffzyklus mitzuwirken. Die durch in vitro-Experimente nachgewiesene Abnahme der Transkriptmenge kann auch in vivo gezeigt werden. VI wird in allen Entwicklungsstadien von Drosophila exprimiert. Auffällig ist die beschriebene Abnahme beim Übergang von "Intermolt"-Larven (PS 1) zu Larven des frühen (PS 3-6) und späten (mindestens PS 8) 3. Häutungsstadiums. Am häufigsten ist VI -relativ zur Tubulin-mRNA - im 1. Häutungsstadium und in Adulten. Die Transkriptionsrichtung von VI wurde mit Hilfe in vitro-transkribierter RNA ermittelt.

Aus drei verschiedenen cDNA-Bibliotheken wurden cDNA-Klone zu VI isoliert. Sequenzvergleiche von cDNA und zugehöriger genomischer DNA sowie Hybridisierungen der cDNA an immobili-

sierte RNA, restringierte genomische und gesamtgenomische DNA zeigten, daß in zwei Klonen cDNA enthalten ist, die nicht aus dem untersuchten Bereich des Locus 74EF stammt. Der λ -Phage c1 besitzt zwei insertierte Eco RI-Eco RI-Fragmente, von denen das größere sequenziert wurde. 186 Bp der c1-Sequenz fehlen in der sequenzierten genomischen DNA. Das kleinere Fragment ist nicht homolog zu DNA aus 74EF. In gesamtgenomischer, mit Eco RI restringierter DNA hybridisiert ein zusätzliches Fragment mit c1, das nach der Restriktionskarte von 74EF nicht aus diesem Locus stammen kann. Der Klon c12 enthält ebenfalls cDNA unbekannter Herkunft. Er hybridisiert an ein zusätzliches Fragment restringierter gesamtgenomischer DNA und in Speicheldrüsen-RNA an ein zweites Transkript.

Die Entstehung derart hybrider cDNA- bzw. mRNA-Moleküle könnte auf einen als trans-Spleißen bezeichneten Vorgang zurückzuführen sein, bei dem zwei Primärtranskripte unterschiedlicher Genorte durch Entfernung von Intron-Sequenzen in einem dem cis-Spleißen vermutlich ähnlichen Prozeß zusammengefügt werden (Sharp, 1987). In allen bis jetzt dokumentierten Fällen sind dazu jedoch Sequenzen an den Spleißstellen erforderlich, die den für das cis-Spleißen ermittelten Consensussequenzen entsprechen (Krause und Hirsh, 1987). An den Positionen der DNA von 74F, an denen die Übereinstimmung mit der c1- bzw. c12-Sequenz endet, liegen jedoch keine Spleißstellen vor. Der offene Leserahmen von c1 setzt sich 5'-aufwärts über 22 Aminosäuren fort. Die Sequenz in der Umgebung des am weitesten 5'-aufwärts gelegenen ATG-Codons (Position 508 bis 506, Abb. 28A, unterer Strang) weist jedoch keine Ähnlichkeit mit der für Drosophila-Gene gefundenen Consensussequenz des Translationsstarts auf (Regulski et al., 1987). Für den Klon c12, bei dem sich der offene Leserahmen 5'-aufwärts der genomisch lokalisierten Sequenz über weitere 21 Aminosäuren erstreckt, gilt dasselbe (ATG, Position 137 bis 135, Abb. 28B, unterer Strang). Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß die DNA von c1 und c12 nicht durchgehend in beiden Richtungen sequenziert wurde. Fehler in der DNA-Sequenz, die zu Fehlinterpretationen führen können, sind deshalb

nicht auszuschließen. Aus oben genannten Gründen ist es jedoch wahrscheinlicher, daß bei beiden Klonen zwei voneinander unabhängig synthetisierte cDNA-Moleküle artefiziell bei der Herstellung der cDNA-Bibliothek zusammengefügt wurden. Über ähnliche Artefakte ist schon von anderen berichtet worden (Falkenburg et al., 1987). Diese Vermutung wird bei c12 durch eine sich der genomisch lokalisierten Sequenz unmittelbar anschließenden Sequenz von 16 T-Resten unterstützt, die vom Poly(A)-Ende eines zweiten mRNA-Moleküls bei der Herstellung der cDNA-Bibliothek abgeschrieben worden sein könnte. Dafür spricht ebenfalls, daß sich 5'-aufwärts der 16 A-Reste auf dem unteren Strang ein Polyadenylierungssignal (AATAAA, Position 168 bis 163, Abb. 28B, unterer Strang) befindet (Proudfoot, 1984). Auf dem unteren Strang von c12 liegt kein durchgehender offener Leserahmen vor. Es könnte sich hierbei um den 3'-nicht-translatierten Bereich des angenommenen zweiten mRNA-Moleküls handeln, oder es haben mögliche Sequenzfehler zu einer Verschiebung des Leserahmens geführt. Bei dem Klon c1 liegt in beiden Richtungen in der genomisch nicht lokalisierten Sequenz ein durchgehender offener Leserahmen vor, der sich jedoch nicht in der lokalisierten Sequenz fortsetzt. Auch dieses Ergebnis weist auf ein Klonierungsartefakt hin.

Der Vergleich der cDNA-Sequenz von c1, c18 und c113 mit der Sequenz der genomischen DNA zeigt, daß in der codierenden DNA zwei intervenierende Sequenzen enthalten sind. In beiden Fällen entspricht die Nukleotidabfolge der Spleißstellen und des potentiellen Verzweigungspunkts innerhalb der Introns größtenteils den für *Drosophila* ermittelten Consensussequenzen (Cech, 1983; Snyder et al., 1982; Keller und Noon, 1985). Eines der beiden Introns ist mit 55 Bp - im Vergleich zu den meisten dokumentierten intervenierenden Sequenzen - recht kurz. Jedoch gibt es z.B. in einem speicheldrüsen-spezifischen Gen aus *Drosophila* ein Intron von 56 Bp und in viralen Systemen sogar noch kürzere Introns (Shore und Guild, 1986; Padgett et al., 1986). Die beiden Introns sind sehr A+T-reich, wie es häufiger bei Introns und Spacer-Bereichen zwischen zwei Genen der Fall ist (O'Connell und Rosbash, 1984; Shore und Guild, 1986).

Der längste der isolierten cDNA-Klone zu VI, c113, enthält - entsprechend der Transkriptionsrichtung - einen langen offenen Leserahmen, der für 178 Aminosäuren codiert. Es ist anzunehmen, daß das Triplet ATG bzw. AUG in Position 45 bis 47 das Translationsinitiations-Codon des Polypeptids von c113 darstellt, da sich kurz davor, 5'-aufwärts in diesem Leserahmen ein Stop-Codon befindet. Des weiteren spricht die gute Übereinstimmung der Sequenz von Position 38 bis 50 (CACAAAA ATGCAT) mit der für *Drosophila*-Gene gefundenen Consensussequenz des Translationsstarts (ANN(C/A)A(C/A)(C/A)ATGNNN) dafür (Regulski et al., 1987). Ein Purinrest ist dabei drei Nukleotide 5'-aufwärts des Initiations-Codons essentiell. In den meisten Fällen tritt, wie bei c113, ein A auf (s. auch Kozak, 1986). Weiter 5'-aufwärts in der genomischen DNA befindet sich eine potentielle Transkriptionsstart-Sequenz (ATCACTA, Position 1558 bis 1552, Abb. 31). Sie korreliert zwar nicht völlig mit dem in *Drosophila*-Genen beobachteten Consensus ATCAGTC (Snyder et al., 1982), unterscheidet sich aber von der bei einem Aktin-Gen nachgewiesenen Sequenz nur in der letzten Base (ACTACTC, Sanchez et al., 1983). Sollte die Transkription tatsächlich an dieser Stelle (A, Position 1558) beginnen, würde Transkript VI 68 Nukleotide 5'-nicht-translatierter RNA enthalten. Ähnlich kurze 5'-nicht-translatierte Bereiche sind beispielsweise bei Genen speicheldrüsen-spezifischer Sekretionsproteine gefunden worden (s. Shore und Guild, 1986). 20 bis 27 Nukleotide 5'-aufwärts des möglichen Transkriptionsstartpunkts befindet sich eine A+T-reiche Sequenz (TAAATAAT, Position 1585 bis 1578, Abb. 31), die eine leicht abgewandelte TATA-Box sein könnte (TATA(T/A)A(T/A) (Corden et al., 1980). Eine CAAT-Box-ähnliche Sequenz, 70 bis 80 Nukleotide 5'-aufwärts, tritt in der genomischen DNA nicht auf (Benoist et al., 1980). Am 3'-Ende, 26 bis 31 Nukleotide hinter dem Stop-Codon des offenen Leserahmens von c113, befindet sich ein Polyadenylierungssignal. 19 Nukleotide 3'-abwärts beginnt die Poly(A)-Sequenz. Die genaue Länge dieser Sequenz wurde nicht bestimmt. Der Längenvergleich des Klons c113 einschließlich der 68 Basen bis zum putativen

Abb. 31: Genomische DNA-Sequenz und Aminosäuresequenz des Polypeptids von Transkript VI

- I TATA-Box ähnliche Sequenz
- II mögliche Transkriptionsstart-Sequenz
- III mögliche Translationsstart-Sequenz
- IV Stop-Codon des offenen Leserahmens
- V Polyadenylierungssignal
- VI Beginn der Poly(A)-Sequenz von Transkript VI

```

      1591      1581      1571      1561 * 1551      1541
TATAATCGATAAGCCTAAATAATGTTATTTCCCTTCTACTCATCCTAAAGCTAAGAAAA
      I                      II

      1531      1521      1511      1501      1491      1481
TGTAACAACGACGTGGACGTAGTAAATTTAATTAGAATTAGCCACAAAAATGCAATAAAT
      MetHisLysC
                        III

      1471      1461      1451      1441      1431      1421
GTGCTATATTTCTTCTACTGGCTTTAAGTGTAAGTTATGTCTGAAGCTAAGACATGTTTT
ysAlaIlePheLeuLeuLeuAlaLeuSer>----- Intron 1 -----

      1411      1401      1391      1381      1371      1361
TAATATATATTTTATACCCTACAGTGCCAGCAAATTCAAGCCGAATTGACGGCGCGCGAC
----- <CysGlnGlnIleGlnAlaGluLeuThrAlaAlaAsp

      1351      1341      1331      1321      1311      1301
TGCCGGGCGTGGGTTTTATTAAGGCCAGTTAATGTGTTCCAGTTGCGAAAACTGGAT
CysArgAlaLeuGlyPheIleLysAlaGlnLeuMetCysSerSerCysGluLysLeuAsp

      1291      1281      1271      1261      1251      1241
GATTTTCGGATTGGATACCATCAAGTGGGTTCATAACATTTAATTAATCTAGCTTTGGAG
AspPheGlyLeuAspThrIleLy>----- Intron 2 -----

      1231      1221      1211      1201      1191      1181
TTGTAAAGATACCCATGAACATGCTATAATCATTCCATAAGAAGACCTGAAAATTGTTT
-----

```

1171 1161 1151 1141 1131 1121
AATTAATATGTTAATCTAATTAGATCAGGTTAAATTTTCATACCTCATTTTAAATATTCCA

1111 1101 1091 1081 1071 1061
ACCAAAAAATGCTTAGCTTAGCTTAAGTCTCCTCCATACCACTGACTAAATATGATTCT

1051 1041 1031 1021 1011 1001
TCCTTCAGTTTTTTAATAACAAAAATTATATTAACCTTTTATAGTTTCTGCTTGAGCCCAT

991 981 971 961 951 941
TGCTCTTTTTTATTTCATCCAAAAACATTTTTTAACATTTTCAGGCCTCAGTGTAAAGCAATGCT
-----◀sProGlnCysLysGlnCysC

931 921 911 901 891 881
GCACTTTGGATCAGCAGCCGGCGGCACAGCGGACATATGCCAAGGCAATTCTGAGTGTGC
ysThrLeuAspGlnGlnProAlaAlaGlnArgThrTyrAlaLysAlaIleLeuSerValH

871 861 851 841 831 821
ACCTGCAAATTCGGGGCCTATCCGCAGATTTCAGGCCTTTATTCAAAGCGCGCCGACCTGCC
isLeuGlnIleProGlyLeuSerAlaAspSerGlyLeuTyrSerLysArgProThrCysG

811 801 791 781 771 761
AAGTTCCCCAACCTGCAGATCAAAATACGTAAGAGGACTGGATCCCGCTGGTTAAAGCTCC
lnValProGlnProAlaAspGlnIleArgLysArgThrGlySerArgTrpLeuLysLeuL

751 741 731 721 711 701
TAGATGCCAGTGGCAAAGTGCAGGAGACGTTGTCCATAACCAAGTGGAACACAGACTG
euAspAlaSerGlyLysValGlnGluThrLeuSerIleThrLysTrpAsnThrAspThrV

691 681 671 661 651 641
TCGAGGAGTTCTTCGAAACGCATCTGGCCAAGGATGGTGCCGGCAAGAAATTCGTACAGCG
alGluGluPhePheGluThrHisLeuAlaLysAspGlyAlaGlyLysAsnSerTyrSerV

631 621 611 601 591 581
TGGTGGAGGATGCCGATGGAGATGACGATGAAGATTACCTGCGAACCAACAGGATCTAAA
alValGluAspAlaAspGlyAspAspAspGluAspTyrLeuArgThrAsnArgIleEnd

IV

571 561 551 541 531 521
ATAAGCATACCAAACTGTAGATTAAATAAAATCCGAAACAAAACCTATAGACCGTACCATT

V

▲
VI

Transkriptionsstart mit der gelelektrophoretisch bestimmten Transkriptlänge von 0,8 bis 0,9 kB ergibt aber eine Poly(A)-Sequenz von ca. 150 bis 250 Nukleotiden. Zusammenfassend kann gesagt werden daß zwar die genaue Lage des 5'-Endes von Transkript VI experimentell nicht bewiesen wurde, es aber sehr wahrscheinlich ist, daß der Klon c113 die vollständige proteincodierende Sequenz von VI enthält. In Abb. 31 sind die aus den Sequenzdaten erhaltenen Ergebnisse zusammengefaßt.

Das aus c113 ableitbare Polypeptid besteht aus 178 Aminosäuren. Abb. 32 zeigt eine Hydropathie-Analyse des Proteins, die mit einem von T. Karsch entwickelten Computer-Programm, basierend auf Hydropathie-Werten von Kyte und Doolittle, durchgeführt wurde (Kyte und Doolittle, 1982). In dem sauren, überwiegend hydrophilen Polypeptid fällt ein stark hydrophober Bereich am N-Terminus auf. Bei dieser Aminosäuresequenz könnte es sich um ein Signal-Peptid handeln, durch das sekretorische Proteine für den Transport aus der Zelle, d.h. für die Translokation der naszierenden Peptidkette durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums, gekennzeichnet sind. Außerhalb der Zelle werden das Signal-Peptid durch Endopeptidasen abgespalten und das reife Protein freigesetzt. Signal-Peptide sowohl aus Prokaryoten als auch aus Eukaryoten besitzen einige allgemeine Charakteristika, die auch auf das Protein von Transkript VI zutreffen. So befinden sich am N-Terminus ein oder mehrere basische Aminosäure-Reste (bei VI Lys). Es folgt ein Bereich von 8 bis 12 hydrophoben Resten, unter ihnen sehr häufig Leucin (bei VI viermal). Am C-Terminus des Signal-Peptids, unmittelbar an der Spaltstelle der Endopeptidasen, treten bevorzugt Aminosäuren mit kleinen unpolaren Seitenketten auf (Hortin, 1986). Von Heijne hat aus den Sequenzdaten von 78 eukaryotischen Signal-Peptiden Regeln abgeleitet, die die Spaltstelle am Ende des Signal-Peptids mit großer Wahrscheinlichkeit voraussagen (Von Heijne, 1983). Auf c113 angewandt, ergibt sich eine mögliche Spaltstelle zwischen den Aminosäuren 24 (Ala) und 25 (Asp). Danach bestünde das Signal-Peptid aus 24 Aminosäuren. Bemerkenswert an dem Polypeptid ist weiterhin, daß in den 99

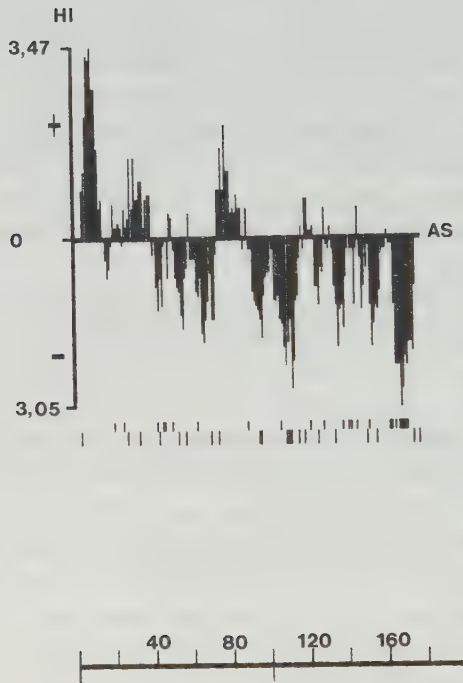


Abb. 32: Hydropathie-Analyse des aus der cDNA-Sequenz von c113 abgeleiteten Polypeptids

In der Abszisse sind die Aminosäuren numeriert (AS). Links befindet sich dementsprechend der N-Terminus, rechts der C-Terminus des Polypeptids. In der Ordinate ist der Hydropathie-Index angegeben (HI). Die Hydropathie-Werte wurden jeweils über 7 Aminosäuren gemittelt. Positive Werte entsprechen hydrophoben, negative hydrophilen Bereichen innerhalb des Polypeptids.

N-terminalen Aminosäuren Cystein überdurchschnittlich oft auftritt (9 aus 99 Aminosäuren), während im C-terminalen Bereich (79 Aminosäuren) kein Cystein vorhanden ist. Cysteinreich sind beispielsweise speicheldrüsenspezifische Sekretionsproteine von *Drosophila* (Shore und Giuld, 1986) ("Glue"-Proteine), mit denen sich Larven vor der Metamorphose an ein

geeignetes Substrat heften. "Glue"-Proteine werden jedoch im Gegensatz zu VI nur in Speicheldrüsen von Larven des 3. Häutungsstadiums synthetisiert. Sie sind in Zwischenhäutungs-puffs codiert. Deshalb ist auszuschließen, daß es sich bei VI um ein weiteres, bisher unbekanntes "Glue"-Gen handelt.

Der Codon-Gebrauch für dieses Polypeptid entspricht teilweise der Codon-Präferenz von *Drosophila* (s. Cherbas et al., 1986). Bei den Codons für die Aminosäuren Ile, Ser, Pro, His, Asp und Arg, bei denen einige der möglichen Triplets oft stark bevorzugt werden, sind Abweichungen festzustellen. Das stimmt mit der Annahme überein, daß die Translation der mRNA oft transkribierter Gene durch den Gebrauch von Triplets für häufige tRNAs begünstigt wird, während es bei weniger häufig transkribierten Genen nicht nachteilig zu sein scheint, auch Codons für seltenere tRNAs zu benutzen (Bennetzen und Hall, 1982).

Ein Vergleich der Sequenz von c113 mit den in 2.9.4. angegebenen Datensammlungen weist auf eine sich über 86 Aminosäuren erstreckende, 35 %ige Homologie zu der β -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase von *E. coli* (E.C. 2.7.7.6.) hin (Ovchinnikov et al., 1981) (Abb. 33). Unter Berücksichtigung des Austauschs homologer Aminosäuren erhöht sich dieser Wert auf 48 %. Auf Nukleinsäureebene ist die Ähnlichkeit geringer. Nur 97 von 278 Bp sind identisch. Die β -Untereinheit der RNA-Polymerase von *E. coli* und die 140kD-Untereinheit der RNA-Polymerase II von *Drosophila* sind in neun Regionen innerhalb der Polypeptidkette homolog (Falkenburg et al., 1987). Neben der strukturellen wird auch eine funktionelle Verwandtschaft dieser konservierten Bereiche postuliert, obwohl bis heute nur sehr wenig über die Beziehungen zwischen Struktur und Funktion der einzelnen Untereinheiten eukaryotischer RNA-Polymerasen bekannt ist (s. Sentenac, 1985). Zur 140 kD-Untereinheit der RNA-Polymerase II von *Drosophila* weist das aus der DNA-Sequenz von c113 abgeleitete Polypeptid keinerlei Homologie auf, während die Homologie zur β -Untereinheit der *E. coli*-RNA-Polymerase zwischen den konservierten Regionen VII und VIII liegt (s. Falkenburg, 1987). Ob dieser Ähnlichkeit eine biologische Signifikanz zu-

69	GlnArgThrTyrAlaLysAlaIleLeuSerValHisLeuGlnIleProGlyLeuSerAla	
952	GlnLeuLysGlnAlaLysLysAspLeuSerGluGluLeuGlnIle	LeuGluAla
	* * *	* * *
89	AspSerGlyLeuTyrSerLysArgProThrCysGlnValProGlnPro	AlaAsp
970	GlyLeuPheSerArgIleArgAlaValLeuValAlaGlyGlyValGluAlaGlu	
	* *	* * *
107	GlnIleArgLysArgThrGlySerArgTrpLeuLysLeu	LeuAspAlaSerGlyLys
988	LysLeuAspLysLeuProArgAspArgTrpLeuGluLeuGlyLeuThrAspGluGluLys	
	* *	* * *
126	ValGlnGluThrLeuSerIleThrLysTrpAsnThrAspThrValGluGluPhePheGlu	
1008	GlnAsnGlnLeuGluGlnLeuAlaGluGlnTyrAspGluLeuLysHisGluPheGlu	
	* *	* * *
146	ThrHisLeu	AlaLys 150
1027	LysLysLeuGluAlaLys	1032
	* *	

Abb. 33: Aminosäuresequenz-Vergleich zwischen dem aus der DNA-Sequenz von c113 abgeleiteten Polypeptid und der β -Untereinheit der RNA-Polymerase von E. coli

In der jeweils oberen Zeile sind die Aminosäuren von c113 angegeben, in der unteren die der β -Untereinheit der E. coli-RNA-Polymerase. (*) bezeichnet Aminosäureunterschiede, (•) unterschiedliche, aber chemisch ähnliche Aminosäuren.

kommt oder nicht, kann ohne weitere experimentell ermittelte Daten nicht entschieden werden. Denkbar wäre es jedoch, daß das Genprodukt von VI in Form einer kleinen Untereinheit des multimeren RNA-Polymerase-Komplexes z.B. eine regulatorische Funktion übernimmt, die in Bakterien von einem integralen Bestandteil der β -Untereinheit ausgeübt wird. Beispiele für kleine regulatorische Untereinheiten, die unter bestimmten physiologischen Bedingungen die Enzymaktivität und -spezifität des multimeren Komplexes verändern, liegen in bakteriellen Systemen bei einem hitzeschockspezifischen Sigma-Faktor

der RNA-Polymerase von E. coli (Landick et al., 1984; Straus et al., 1987) und verschiedenen Sigma- und sigma-dissoziierenden Faktoren von B. subtilis vor (Losick et al., 1986). In Bakteriophagen von B. subtilis sind wiederum andere Sigma-Faktoren codiert, die es der bakteriellen RNA-Polymerase ermöglichen, Phagenpromotoren zu erkennen (Losick et al., 1986). In Hefe, einem Eukaryoten, ist ebenfalls ein Faktor gefunden worden, der die Spezifität einer RNA-Polymerase, in diesem Fall einer mitochondrialen, beeinflusst (Schinkel et al., 1987).

Erst nach Untersuchungen des Proteinprodukts von Transkript VI werden Aussagen über die Funktion gemacht werden können. Deshalb wurde damit begonnen, cDNA von VI in Expressionsvektoren zu klonieren und in Bakterien zu exprimieren (Hirschberg, persönliche Mitteilung). Dadurch können größere Mengen eines Fusionsproteins von VI isoliert und zur Produktion polyclonaler Antikörper eingesetzt werden. Mit Hilfe dieser Antikörper wird es möglich sein, das native Protein aufzureinigen und so einer direkten Analyse zugänglich zu machen. Durch Immunfluoreszenz-Experimente werden die Gewebespezifität von VI in den verschiedenen Entwicklungsstadien von *Drosophila*, die Verteilung innerhalb der Zellkompartimente eines bestimmten Gewebes und, falls es sich um ein im Zellkern lokalisiertes Protein handelt, die mögliche Wechselwirkung mit dem Chromatin polytärer Chromosomen untersucht werden können. Um mehr über die Regulation der Genexpression von VI zu erfahren, bieten sich in vitro-Transkriptionssysteme und P-Element-Transformationen an, bei denen z.B. dem Einfluß modifizierter Sequenzen, 5'-aufwärts des Transkriptionsstarts, nachgegangen werden kann.

5. Zusammenfassung

Die Transkriptanalyse der proximalen DNA des ecdysteroidinduzierten Puffs 74EF von D. melanogaster mit RNA aus in vitro mit β -Ecdyson inkubierten Speicheldrüsen und Fettkörpern von Larven des 3. Häutungsstadiums führte zum Nachweis von acht z.T. gewebespezifisch synthetisierten Transkripten. Bei keinem dieser Transkripte wurde eine Hormonabhängigkeit der Genexpression beobachtet. Zu einigen Transkripten wurden cDNA-Klone für eine genauere Charakterisierung isoliert. Ein Transkript, dessen Menge in inkubierten Speicheldrüsen zunimmt und ein anderes, dessen Menge in in vitro-inkubierten Speicheldrüsen ebenso wie in vivo abnimmt, wurden näher untersucht. Es wurden in beiden Fällen die Transkriptionsrichtung bestimmt, die transkribierte DNA eingegrenzt und die Expression in den verschiedenen Entwicklungsstadien von D. melanogaster verfolgt. Sowohl die genomische DNA als auch die cDNA des letzteren Transkripts wurden sequenziert. Die transkribierte DNA enthält zwei Introns. Sie codiert für 178 Aminosäuren eines Polypeptids mit einem Molekulargewicht von 19,7 kD, in dem möglicherweise ein Signalpeptid enthalten ist. Der Vergleich der Aminosäuresequenz mit einer Protein-Datenbank zeigte eine Homologie des Polypeptids zu der β -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase von E. coli auf.

6. Literaturverzeichnis

- R. K. Appleyard (1954)
Genetics 39, 440-452
- S. Artavanis-Tsakonas, B. G. Grimwade, R. G. Harrison, K. Markopoulou, M. A. T. Muskavitch, R. Schlesinger-Bryant, K. Wharton, B. Yedvobnick (1984)
Dev. Genet. 4, 233-244
- S. Artavanis-Tsakonas, P. Schedl, M.-E. Mirault, L. Moran, J. Lis (1979)
Cell 17, 9-18
- M. Ashburner (1972)
Chromosoma 38, 255-281
- M. Ashburner (1973)
Dev. Biol. 35, 47-61
- M. Ashburner (1974)
Dev. Biol. 39, 141-157
- M. Ashburner, J. J. Bonner (1979)
Cell 17, 241-254
- M. Ashburner, C. Chihara, P. Meltzer, G. Richards (1974)
CSH Symp. Quant. Biol. 38, 655-662
- M. Ashburner, G. Richards (1976)
Dev. Biol. 54, 241-255
- H. Aviv, P. Leder (1972)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412
- J. M. Bailey, N. Davidson (1976)
Anal. Biochem. 70, 75-85
- A. Baumann (1986)
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum

- H. J. Becker (1959)
Chromosoma 10, 654-678
- W. Beermann (1952)
Chromosoma 5, 139-198
- E. S. Belyaeva, I. E. Vlassova, Z. M. Biyasheva, V. T. Kakpakov, G. Richards, I. F. Zhimulev (1981)
Chromosoma 84, 207-219
- W. Bender, P. Spierer, D. S. Hogness (1983)
J. Mol. Biol. 168, 17-33
- J. L. Bennetzen, B. D. Hall (1982)
J. Biol. Chem. 257, 3026-3031
- C. Benoist, K. O'Hare, R. Breathnach, P. Chambon (1980)
Nucleic Acids Res. 8, 127-142
- W. D. Benton, R. W. Davis (1977)
Science 196, 180-182
- C. B. Bridges (1935)
J. Hered. 26, 60ff
- S. Bialojan, D. Falkenburg, R. Renkawitz-Pohl (1984)
EMBO J. 3, 2543-2548
- H. C. Birnboim, J. Doly (1979)
Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523
- M. D. Brennan, R. G. Rowan, W. J. Dickinson (1984)
Cell 38, 147-151
- G. G. Carmichael, G. K. McMaster (1980)
Methods Enzymol. 65, 380-391
- T. R. Cech (1983)
Cell 34, 713-716

- P. Cerencov (1934)
Akad. Nauk. SSSR Dokl. 2, 451
- E. Y. Chen, P. H. Seeburg (1985)
DNA 4, 165-170
- L. Cherbas, R. A. Schulz, M. M. D. Koehler, C. Savakis, P. Cherbas (1986)
J. Mol. Biol. 189, 617-631
- V. Corces, R. Holmgren, R. Freund, R. Morimoto, M. Meselson (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5390-5393
- J. Corden, B. Wasylyk, A. Buchwalder, P. Sassone-Corsi, C. Keding, P. Chambon (1980)
Science 209, 1406-1414
- A. E. Dahlberg, E. J. Stellwag (1983)
Methods Enzymol. 100, 326-333
- D. T. Denhardt (1966)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 641-652
- W. Dingmann, M. B. Sporn (1962)
Biochim. Biophys. Acta 61, 164-177
- C. Dony, P. Gruss (1987)
EMBO J. 6, 2965-2975
- B. Dworniczak, R. Seidel, O. Pongs (1983)
EMBO J. 2, 1323-1330
- D. Falkenburg, B. Dworniczak, D. M. Faust, E. K. F. Bautz (1987)
J. Mol. Biol. 195, 929-937
- G. Feigl (1986)
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum

- J. R. Feramisco, J. E. Smart, K. Burrridge, D. M. Helfmann,
G. P. Thomas (1982)
J. Biol. Chem. 257, 11024-11031
- A. Garen, L. Kauvar, J.-A. Lepesant (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5099-5103
- H. Garoff, W. Ansorge (1981)
Anal. Biochem. 115, 450-457
- W. J. Gehring, Y. Hiromi (1986)
Ann. Rev. Genet. 20, 147-173
- D. A. Goldberg (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5794-5798
- T. D. C. Grace (1962)
Nature 195, 788-789
- M. Gram (1986)
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- H. Gronemeyer, O. Pongs (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2079-2083
- J. D. Harding, A. E. Przybyla, R. J. MacDonald, R. L.
Pictet, W. J. Rutter (1978)
J. Biol. Chem. 253, 7531-7537
- P. Hirschberg (1984)
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- G. Hortin (1986)
in: Protein Compartmentalization
hrg. v. A. W. Straus, I. Boime, G. Kreil
Springer Verlag, Berlin
- T. V. Huyngh, R. A. Young, R. W. Davis (1984)
in: DNA Cloning Techniques
hrg. v. D. Glover, IRL Press, Oxford

- A. L. Joyner, T. Kornberg, K. G. Coleman, D. R. Cox, G. R. Martin (1985)
Cell 43, 29-37
- J. Karn, S. Brenner, L. Barnett, G. Cesareni (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5172-5176
- E. B. Keller, W. A. Noon (1985)
Nucleic Acids Res. 13, 4971-4979
- W. Koerwer (1983)
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- M. Kozak (1986)
Cell 44, 283-292
- J. Krause, R. F. Hirsh (1987)
Cell 49, 753-761
- J. Kyte, R. F. Doolittle (1982)
J. Mol. Biol. 157, 105-132
- R. Landick, V. Vaughn, E. T. Lau, R. A. VanBogelen, J. W. Erickson, F. E. Neidhardt (1984)
Cell 38, 175-182
- R. A. Laskey, A. D. Mills (1977)
FEBS Lett. 82, 314-316
- H. Lehrach, D. Diamond, J. M. Wozney, H. Boedtker (1977)
Biochemistry 16, 4743-4751
- J.-A. Lepesant, M. Levine, A. Garen, J. Lepesant-Kejzlarova, L. Rat, G. Somme-Martin (1982)
J. Mol. Appl. Genet. 1, 371-383
- R. Losick, P. Youngman, P. J. Piggot (1986)
Ann. Rev. Genet. 20, 625-699

- H.-J. Lüdecke (1985)
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- A. P. Mahowald, P. A. Hardy (1985)
Ann. Rev. Genet. 19, 149-177
- T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook (1982)
in: Molecular Cloning: A Laboratory Manual
CSH Laboratory Press, New York
- T. Maniatis, R. C. Hardison, E. Lacy, J. Lauer, C. O'Connel,
D. Quon (1978)
Cell 15, 687-701
- D. A. Melton, P. A. Krieg, M. R. Rebagliati, T. Maniatis, K.
Zinn, M. R. Green (1984)
Nucleic Acids Res. 12, 7035-7056
- E. M. Meyerowitz, D. S. Hogness (1982)
Cell 28, 165-176
- J. Messing (1983)
Methods Enzymol. 101, 20-78
- T. Möritz (1985)
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- T. Möritz, J. E. Edström, O. Pongs (1984)
EMBO J. 3, 289-295
- N. E. Murray (1983)
in: Lambda II
hrg. v. R. W. Hendrix, J. W. Roberts, F. W. Stahl, R.
A. Weisber, CSH Laboratory Press, New York
- M. A. T. Muskavitch, D. S. Hogness (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7362-7366
- J. E. Natzle, B. J. McCarthy (1984)
Dev. Biol. 104, 187-198

- P. O'Connell, M. Rosbash (1984)
Nucleic Acids Res. 12, 5495-5513
- Y. Ovchinnikov, G. Monastyrskaya, V. Gubanov, O. Chertov, N. Modjanov, V. Grinkevich, T. Markova, I. Polovnikova, V. Lipkin, E. Sverdlov (1981)
Eur. J. Biochem. 116, 621-629
- R. A. Padgett, P. J. Grobowski, M. M. Konarska, S. Seiler, P. A. Sharp (1986)
Ann. Rev. Biochem. 55, 1119-1150
- T. S. Painter (1934)
Genetics 19, 175-188
- M. L. Pardue, J. G. Gall (1975)
in: Methods in Cell Biology, Vol. 10
hrg. v. D. Prescott, Academic Press, New York
- S. J. Poole, L. M. Kauvar, B. Drees, T. Kornberg (1985)
Cell 40, 37-43
- A. Preiss, U. B. Rosenberg, A. Kienlin, E. Seifert, H. Jäckle (1985)
Nature 313, 27-32
- N. Proudfoot (1984)
Nature 307, 412-413
- M. Ptashne (1986)
Nature 322, 697-701
- C. Queen, L. J. Korn (1984)
Nucleic Acids Res. 12, 581-599
- R. Raghow (1987)
TIBS 12, 358-360
- C. P. F. Redfern, M. Bownes (1983)
Mol. Gen. Genet. 189, 432-440

- M. Regulski, N. McGinnis, R. Chadwick, W. McGinnis (1987)
EMBO J. 6, 767-777
- M. Rentrop (1984)
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- G. Richards (1976)
Dev. Biol. 54, 264-275
- G. Richards (1981)
Mol. Cell. Endocrinol. 21, 181-197
- G. Richards (1982)
Wilhelm Roux's Archives 191, 101-111
- P. W. J. Rigby, M. Diekmann, C. Rhodes, P. Berg (1977)
J. Mol. Biol. 113, 237-251
- F. Rijsewijk, M. Schuermann, E. Wagenaar, P. Parren, D. Weigel, R. Nüsse (1987)
Cell 50, 649-657
- U. B. Rosenberg, C. Schröder, A. Preiss, A. Kienlin, S. Cote, I. Riede, H. Jäckle (1986)
Nature 319, 336-339
- G. M. Rubin, A. C. Spradling (1982)
Science 218, 348-353
- F. Sanchez, S. L. Tobin, U. Rdest, E. Zulauf, B. J. McCarthy (1983)
J. Mol. Biol. 163, 533-551
- F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467
- K. Schaltmann, O. Pongs (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6-10
- A. H. Schinkel, M. A. J. Groot Koerkamp, E. P. W. Touw, H. F. Tabak (1987)
J. Biol. Chem. 262, 12785-12805

- A. Sentenac (1985)
CRC Crit. Rev. Biochem. 18, 31-82
- P. A. Sharp (1987)
Cell 50, 147-148
- E. M. Shore, G. M. Guild (1986)
J. Mol. Biol. 190, 149-158
- M. Snyder, M. Hunkapiller, D. Yuen, D. Silvert, J. Fristrom,
N. Davidson (1982)
Cell 29, 1027-1040
- E. M. Southern (1975)
J. Mol. Biol. 98, 503-517
- A. C. Spradling, G. M. Rubin (1982)
Science 218, 341-347
- D. B. Straus, W. A. Walter, C. A. Gross (1987)
Nature 329, 348-351
- D. Tautz, M. Renz (1983)
Anal. Biochem. 132, 14-19
- A. J. Twigg, D. Sherratt (1980)
Nature 283, 216-218
- A. Vincent, P. O'Connell, M. R. Gray, M. Rosbash (1984)
EMBO J. 3, 1003-1013
- G. Von Heijne (1983)
Eur. J. Biochem. 133, 17-21
- V. K. Walker, M. Ashburner (1981)
Cell 26, 269-277
- P. K. Wellauer, I. B. David (1973)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2827-2831

C. Yanish-Perron, J. Vierra, J. Messing (1985)
Gene 33, 103-119

R. A. Young, R. W. Davis (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1194-1198

I. F. Zhimulev, M. L. Isquierdo, M. Lewis, M. Ashburner
(1981)
Wilhelm Roux's Archives 190, 351-357

Lebenslauf

10.09.1958	geboren in Witten
1965 - 1968	Besuch der Grundschule in Witten
1968 - 1977	Besuch des städtischen Schillergymnasiums in Witten
07.06.1977	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am städtischen Schillergymnasium in Witten
1977 - 1983	Studium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
1982 - 1983	Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie der Fakultät für Chemie bei Herrn Prof. Dr. O. Pongs
16.06.1983	Diplom-Hauptprüfung in Chemie
1983 - 1987	Anfertigung der Dissertation am Lehrstuhl für Biochemie der Fakultät für Chemie bei Herrn Prof. Dr. O. Pongs

